

**Abschlußbericht an das**

**Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Technologie**

**53170 Bonn**

**Forschungsvorhaben: 0311430 / 0**

**Verbundprojekt:** Naturstoffe als neue funktionelle Salz- und Süßstoffe  
zur Gesundheitsprophylaxe

**Zahlungsempfänger:** UNION Deutsche Lebensmittelwerke

**Projektleiter:** Dr. K. Ragotzky

**Förderzeitraum:** 1.1.1998 - 30.12.2000

**Adresse:** Postfach 10 15 09, 20010 Hamburg

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>KURZE VORHABENS DARSTELLUNG .....</b>	<b>5</b>
I. AUFGABENSTELLUNG .....	5
II. VORAUSSETZUNGEN.....	5
<i>Vorstudien zum Süßrezeptor:.....</i>	5
<i>Expertise:.....</i>	6
<i>Vorstudien zum humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal (hENaC):.....</i>	6
<i>Expertise:.....</i>	6
III. PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS.....	7
<i>Humaner epithelialer Na<sup>+</sup>-Kanal (hENaC).....</i>	7
<i>Süßrezeptor.....</i>	8
Ursprüngliche Planung.....	8
Angepaßte Planung (1.11.1999).....	8
IV. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND ZU PROJEKTBEGINN.....	9
<i>Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (hENaC) induzieren.....</i>	9
<i>Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden.....</i>	10
V. ZUSAMMENARBEIT MIT ANDEREN STELLEN .....	10
 <b>ERGEBNISBERICHT.....</b>	 <b>11</b>
 <b>I. ERZIELTES ERGEBNIS .....</b>	 <b>11</b>
I.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na <sup>+</sup> -KANALS (hENaC) INDUZIEREN .....	11
I.I.I..... <i>Entwicklung des zellulären Testsystems zur Aktivitätsbestimmung von Na<sup>+</sup>-Kanälen für hohen Probendurchsatz.....</i>	11
I.I.II. <i>Verwendung des Tests zur Messung der hENaC-Aktivität.....</i>	12
I.I.III. <i>Durchmusterung einer Tripeptidbank mit dem hENaC-Aktivitätstest.....</i>	13
I.I.IV. <i>Optimierungsansätze zur Stabilisierung der hENaC-Expression.....</i>	14
I.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	17
I.I.I..... <i>Universität Stuttgart-Hohenheim: Expressionsklonierung eines Thaumatinrezeptorgens.....</i>	17
I.I.I.I. Construction of the cDNA library.....	17
I.I.I.II. Expression screening.....	17
I.I.I.III. Screening results .....	19
I.I.I.IV. Conclusions .....	21
I.I.II. .... <i>JERINI Biotoools: Konstruktion eines Hefestammes zur Identifizierung und Klonierung des Süß-Rezeptors von Geschmackssinneszellen .....</i>	22
I.I.II.I. Zielsetzung dieses Teilvorhabens .....	22
I.I.II.II. Der Lebenszyklus von Hefe .....	22
I.I.II.III. Der Pheromonsignalweg von Hefe .....	23
I.I.II.IV...Herstellung eines gentechnisch veränderten Hefestammes zur Visualisierung der Kopplung eines GPCRs an den PRP .....	24
I.I.II.V. Erhöhung der Sensitivität des PRPs der Reporterhefe.....	27
I.I.II.VI.....Heterologe Expression und funktionale Kopplung eines Modell-GPCRs an den PRP der Reporterhefe.....	29
I.I.II.VII. Chimäre G-Proteine und die funktionale Kopplung weiterer GPCRs an den PRP einer Reporterhefe.....	31
I.I.II.VIII. Zusammenfassung.....	34

<i>I.II.III. ....LION Biosciences, University Stuttgart-Hohenheim and Unilever: Identification of taste receptor genes.....</i>	<i>35</i>
I.II.III.I. .. Generation of cDNA-libraries and enrichment of taste-specific cDNA-fragments by subtractive PCR followed by spotting of differential cDNAs on filter array .....	35
I.II.III.II. Elimination of redundant genes on filter array by repetitive hybridisation .....	36
I.II.III.III. Sequencing and primary sequence analysis of remaining clones.....	37
I.II.III.IV. Homology searches by BLAST .....	39
I.II.III.V. Result of data analysis .....	40
I.II.III.VI. ....Development of analysis strategy for the 1.962 cDNA sequences identified as unknown from rat taste bud tissue.....	42
I.II.III.VII. ... Status report of bioinformatical analysis of 4096 cDNAs from taste bud tissue and sequenced by LION (Status Feb. 2001).....	48
I.II.III.VIII. Verlauf der weiteren bioinformatischen Analyse der cDNA-Klone .....	49
<b>II. VORAUSSICHTLICHER NUTZEN (VERWERTBARHEIT) .....</b>	<b>58</b>
II.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na <sup>+</sup> -KANALS (hENAC) INDUZIEREN .....	58
II.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	58
<b>III. FORTSCHRITT AUSSERHALB DES PROJEKTES .....</b>	<b>59</b>
III.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na <sup>+</sup> -KANALS (hENAC) INDUZIEREN .....	59
III.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	59
<b>IV. VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>60</b>
IV.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na <sup>+</sup> -KANALS (hENAC) INDUZIEREN .....	60
IV.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	60
<b>V. LITERATUR:.....</b>	<b>61</b>

#### **ANLAGE I: ERFOLGSKONTROLLBERICHT .. FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

- I. BEITRAG AN FÖRDERPOLITISCHEN ZIELEN DES PROGRAMMS..... **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- II. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER ERFOLG DES VORHABENS, NEBENERGEBNISSE,  
GESAMMELTE WESENTLICHE ERFAHRUNGEN .....
- II.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE  
    ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na<sup>+</sup>-KANALS (hENAC)  
    INDUZIEREN .....
- II.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR  
    DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN .....
- III. EINHALTUNG DES KOSTEN- UND ZEITPLANS .....
- III.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE  
    ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na<sup>+</sup>-KANALS (hENAC)  
    INDUZIEREN .....
- III.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR  
    DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN .....

IV. VERWERTUNG DER ERGEBNISSE INKL. VERWERTUNGSMÖGLICHKEITEN ..... **FEHLER!  
TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

IV.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE  
ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN  $\text{Na}^+$ -KANALS (hENAC)  
INDUZIEREN ..... **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

IV.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR  
DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN ..... **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

V. ERFINDUNGEN ETC..... **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

VI. ARBEITEN DIE ZU KEINER LÖSUNG GEFÜHRT HABEN ..... **FEHLER! TEXTMARKE NICHT  
DEFINIERT.**

**ANLAGE II: BERICHTSBLATT MIT KURZFASSUNG..... 66**

-

## Kurze Vorhabensdarstellung

### ***I. Aufgabenstellung***

Im Rahmen des geplanten Projekts sollte versucht werden, mit modernen biotechnologischen Ansätzen eine Methodik zur Suche nach neuen funktionellen Geschmacksubstanzen für die sensorischen Geschmacksqualitäten ‚Süß‘ und ‚Salzig‘ zu entwickeln. Dieses sollte durch biomolekulares "Screening" nach Geschmacksrezeptorliganden für einen Süßstoff-Rezeptor und für einen der Ionenkanäle, die den Salzgeschmack vermitteln, erfolgen. Die molekulare Identifizierung und Charakterisierung dieser beiden Zielproteine ist im Hinblick auf die Entwicklung von spezifischen Aktivatoren und Modulatoren besonders interessant; bei ausreichender Spezifität können entsprechende Substanzen die Sinnesmodalitäten „süß“ oder „salzig“ auslösen. Sie können daher unter Umständen auch für die Produktion von gesünderen Lebensmitteln verwendbar sein. Peptide, produziert aus natürlichen Eiweißen, sind dafür die geeigneten Kandidaten, da sie neben der Verdaubarkeit auch genügend Strukturdiversität aufweisen, um Rezeptorspezifische Interaktionen eingehen zu können.

### ***II. Voraussetzungen***

Es wurde vom bisherigen Stand der Forschung wird davon ausgegangen, daß die Wahrnehmung der verschiedenen Geschmacksqualitäten durch zumindest zwei unterschiedliche Klassen von Membranproteinen in den Sinneszellen eingeleitet wird (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Ionenkanäle), wobei der noch unidentifizierte Rezeptor für Süßstoffe vermutlich zur ersten Klasse gehört, während einer der Ionenkanäle, die den Salzgeschmack vermitteln, dementsprechend in die zweite Klasse eingeteilt werden kann. Es wurde hiermit daher jeweils ein Modellprotein dieser zwei Proteinklassen mit biotechnologischen Ansätzen analysiert. Die verschiedenen Teilaspekte dieses Antrags wurden dabei von 3 renommierten Forschungsgruppen zusammen mit der Union Deutsche Lebensmittelwerke (UDL) bearbeitet.

#### Vorstudien zum Süßrezeptor::

##### **Institut für Physiologie der Universität Hohenheim:**

Optimierung von mRNA-Isolierungsprozeduren für gustatorisches Zungengewebe;

##### **UDL, vertreten durch URL Vlaardingen:**

Isolierung und Aufreinigung von Thaumatin I in Grammengen; Entwicklung eines Versuchsprotokolls zur radioaktiven Markierung von geschmacksaktivem Thaumatin.

##### **LION Biosciences AG (Im Auftrag von Unilever):**

Isolierung und bioinformatische Analyse von differentiell exprimierten Genen aus Geschmacksknospen mit Hilfe von Subtraktions-PCR.

Expertise:**Institut für Physiologie der Universität Hohenheim:**

Erfahrung mit der Kultur und Transfizierung (stabil, transient) von eukaryontischen Zelllinien mit 7TMR- und Reporter-Gen-Konstrukten: Raming et al., 1993; v.Nickisch-Roseneck et al., 1996.

Sachkenntnis bei der Klonierung und funktionellen Expression von chemosensorischen 7TMR: Raming et al., 1993; Kiefer et al., 1996.

**JERINI Bio Tools GmbH, Berlin:**

Entwicklung eines molekularen Suchsystems für Rezeptorliganden mit hoher Durchsatzrate für räumlich adressierbare Banken auf kontinuierlichen Cellulosemembranen: Heinrich et al., 1996; Weiergräber et al., 1995, 1996.

Konstruktion, Synthese und Ligandensuche von kombinatorischen Peptidbanken: Kramer et al., 1993, 1994; Schneider-Mergener et al., 1995; Winkler et al., 1995.

**ASAP GmbH, München:**

Unveröffentlichte Grundlagenprojekte im Firmenauftrag:

Entwicklung von Geschmacksempfindlichkeit und Geschmackspräferenzen im Kindesalter.

Bestimmung der sensorischen Qualität von Süßstoffen, Süßstoffmischungen und unterschiedlich gesüßten Getränken mittels deskriptiver Verfahren, mittels Time-Intensity-Messungen und mittels Konsumentensensorik.

Vom wissenschaftlichen ASAP-Leiter, Prof. Dr. E.P. Köster an der Universität Utrecht betreute und veröffentlichte Doktorarbeiten:

The Sour taste: T.G.J. Ganzevles, 1987

Psychophysics and the Perception of Taste Mixtures: C. Ossebaard, 1993

Spatial Interactions in Taste: M. Linschoten, 1993.

**LION Biosciences AG, Heidelberg**

Generierung und bioinformatische Analyse von gewebespezifischen cDNA-banken

Vorstudien zum humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal (hENaC):**UDL, vertreten durch URL Vlaardingen:**

Produktion einer Zelllinie, die die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des humanen epithelialen Natriumkanals (hENaC) funktionell exprimiert, unter Mitwirkung der Arbeitsgruppe von Prof. P. Barbry am CNRS Institut de Pharmacologie Moleculaire & Cellulaire, Valbonne (Voilley et al., 1994 und 1995).

Expertise:**UDL, vertreten durch URL Vlaardingen:**

Kenntnis in der Klonierung und funktionellen Expression des ENaC Proteinkomplexes: Voilley et al., 1994.

Erfahrung mit Funktionstestsystemen für Ionenkanäle: Tareilus et al., 1997.

**JERINI Bio Tools GmbH, Berlin:**

Entwicklung eines molekularen Suchsystems für Rezeptorliganden mit hoher Durchsatzrate für räumlich adressierbare Banken auf kontinuierlichen Cellulosemembranen: Heinrich et al., 1996; Weiergräber et al., 1995, 1996.



## Süßrezeptor

### Ursprüngliche Planung

- 1.) Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin aus Geschmacksinneszellen.
- 2.) Stabile funktionelle Expression des Süßrezeptors in einem heterologen eukaryontischen Expressionssystem (Zelllinie).
- 3.) Entwicklung eines Testsystems mit hohem Probendurchsatz für die Suche nach Peptiden und anderen chemischen Substanzen, die als funktionelle Agonisten des Süßrezeptors wirken.
- 4.) Nachweis der Funktionsfähigkeit für das zu entwickelnde Testsystem ("Proof of principle").
- 5.) Überprüfung und Evaluierung von identifizierten Peptiden in sensorischen Studien.

Nr.	Aufgabenbezeichnung	Start	Ende	1997		1998				1999				2000						
				Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1		
1	<b>Thaumatin-Rezeptor</b>	1.1.98	1.1.01	[Timeline bar from Q3 1997 to Q1 2000]																
2	Optimierung J125-Thaumatin-Bindung	1.1.98	28.2.97	[Timeline bar from Q3 1997 to Q1 1998]																
3	Expressionsklonierung Rezeptor	1.3.98	30.5.99	[Timeline bar from Q1 1998 to Q3 1999]																
4	*Molek. Identifizierung von Rezeptor	1.6.99		[Timeline bar from Q3 1999 to Q1 2000]																
5	Entwicklg. von Zelllinie u. Testsystem	1.6.99	1.1.00	[Timeline bar from Q3 1999 to Q1 2000]																
6	*Transfer von Testsystem	1.12.99		[Timeline bar from Q4 1999 to Q1 2000]																
7	Suche nach homologen Rezeptoren	1.12.99	1.1.01	[Timeline bar from Q4 1999 to Q1 2000]																
8	Entwicklg. des Liganden-Suchsystems	1.1.98	30.7.98	[Timeline bar from Q3 1997 to Q3 1998]																
9	"Screening" von Peptidbanken	1.1.00	31.4.00	[Timeline bar from Q1 2000 to Q2 2000]																
10	Optimierung von aktiven Liganden	1.5.00	1.9.00	[Timeline bar from Q2 2000 to Q4 2000]																
11	*Transfer von Liganden	1.9.00		[Timeline bar from Q4 2000 to Q1 2001]																
12	Sensorische Analyse von Liganden	1.9.00	1.1.01	[Timeline bar from Q4 2000 to Q1 2001]																

\* Meilenstein

### Angepaßte Planung (1.11.1999)

#### Teilprojekt "Identifizierung von Süß- und anderen Geschmacksrezeptoren"

1. Präparation des 'Tester'-Gewebes (Geschmackspapillen) und des 'Driver'-Gewebes (nichtsensoryisch) [Univ. Stuttgart-Hohenheim, 02/00]
2. Produktion von qualitätskontrollierten cDNA-Banken für 'Tester' und 'Driver' [LION, 04/00]
3. Qualitätskontrollierte 'subtractive PCR' [LION, 06/00]
4. Isolieren und Vereinzeln von 18.000 cDNA clones [LION 07/00]
5. 3 Sequenzier-Runden von 384 Klonen und anschließender Redundanz-Eliminierung [LION, 09/00]
6. Sequenzierung der übrigen cDNAs (Bis zu 4.000) [LION, 10/00]
7. Erste bioinformatische Analyse (FASTA) der cDNAs, Transfer der Klone und der FASTA-Daten nach Hohenheim [LION, 11/00]
8. Test der Analyseprozedur mit erstem Subset von cDNA-Klonen (384) [Univ. Stuttgart-Hohenheim, Unilever, 11/00]



9. Bioinformatische Identifizierung von Rezeptor-Kandidaten für alle cDNA-Klone von LION aus Schritt 7 [Univ. Stuttgart-Hohenheim, Unilever, 12/00]
10. Prioritätsgestaffelte Bestimmung der 'Taste Bud'-Spezifität für alle cDNA-Klone von LION aus Schritt 7 [Univ. Stuttgart-Hohenheim, 10/01] \*
11. Screening von cDNA-Banken mit cDNAs von Rezeptor-Kandidaten [Univ. Stuttgart-Hohenheim, 12/01] \*
12. Funktionelle Expression von Rezeptorkandidaten [Univ. Stuttgart-Hohenheim, Unilever, 06/02] \*
13. Verwendung des Funktionalitätstests für Liganden-Screening [Unilever, 12/02] \*

\* Es wurde dabei mit dem ZG (BEO) vereinbart, daß die aus der Projektabänderung resultierenden Mehrkosten oberhalb des veranschlagten Projektfinanzvolumens zu Kosten von Unilever gehen

#### **IV.        Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn**

##### ***Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (hENaC) induzieren***

Die Perzeption eines Salzzreizes durch Geschmacksinneszellen geschieht offenbar durch mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen: a) Eine apikale Leitfähigkeit für Na<sup>+</sup>-Ionen und b) eine "parazelluläre", vermutlich anionensensitive Komponente (Heck et al., 1984; für eine Übersicht siehe Lindemann, 1996). Die apikale Na<sup>+</sup>-permeable Komponente konnte teilweise durch Amilorid, einer heterozyklischen Carboxy-Guanidin-Verbindung, blockiert werden (Li et al., 1987; Doolin und Gilbertson, 1996). Molekulare Klonierungs- und Expressionsstudien zeigten, daß der Amilorid-sensitive epitheliale Na<sup>+</sup>-Kanal (ENaC) neben einer kanalbildenden  $\alpha$ -Untereinheit noch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten im nativen Kanalproteinkomplex enthält (Canessa et al., 1994; Barbry und Lazdunski, 1995).

In elektrophysiologischen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Bromphenylammonium-Verbindung Bretylium den epithelialen Amilorid-sensitiven Na<sup>+</sup>-Strom erhöht (Ilani et al., 1982). Die Vermutung, daß Bretylium den Salzeindruck von Geschmackstimuli erhöht und daß dieser Effekt durch den Amilorid-sensitiven Na<sup>+</sup>-Kanal vermittelt wird, konnte in ersten psychophysischen Studien bestätigt werden (Schiffman et al., 1983). Eine erhöhte Na<sup>+</sup>-Permeabilität der Zellmembran von Geschmacksinneszellen gilt auch als Ursache für die Verstärkung des Salzgeschmacks, die durch Ionophoren wie Novobiocin ausgelöst wird (Feigin et al., 1994).

### ***Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden***

Die Süßempfindung wird durch Rezeptorproteine in der Zellmembran von Geschmacksinneszellen eingeleitet, die nach Bindung von Süßstoffen eine intrazelluläre Reaktionskaskade aktivieren (Margolskee, 1995). Sowohl biochemische Daten, die eine durch G-Proteine vermittelte Aktivierung von Sekundär-Botenstoff-Systemen durch Süßstoffe zeigen (Striem et al., 1989), als auch Ergebnisse von elektrophysiologischen und "Imaging"-Studien (Avenet und Lindemann, 1988; Cummings et al., 1993; Bernhardt et al., 1996) weisen darauf hin, daß die vermuteten Rezeptoren wahrscheinlich zu der Superfamilie von Rezeptoren mit sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembran-Segmenten gehören (7TMR; Lindemann, 1996).

Der Süßgeschmack einer Substanz ist nicht mit einer einzigen definierten chemischen Struktur korreliert. Es konnte eine breit gefächerte Anzahl von natürlichen und synthetischen Süßstoffen identifiziert werden (Ellis, 1995; Kinghorn und Kennelly, 1995). Trotzdem wurde der Versuch gemacht, eine Strukturregel für Süßstoffe aufzustellen (Shallenberger und Acree, 1967; Tinti und Nofre, 1991); Inzwischen mehrten sich jedoch die Hinweise, daß verschiedene Subtypen von Süßrezeptoren existieren, die Unterschiede in ihrer Liganden-Spezifität aufweisen (diskutiert bei Margolskee, 1995). Keine der bisher identifizierten alternativen Süßstoffe erreicht die "reine" Süßqualität von Sucrose, so daß dieser Zucker trotz seines hohen Kaloriengehalts und seines kariogenen Einflusses in vielen Nahrungsmitteln noch unverzichtbar ist.

Die Identifizierung eines Sucrose-Rezeptors war bisher noch nicht gelungen, was zumindest teilweise auf die geringe Affinität des Rezeptors für seinen nativen Liganden zurückgeführt wurde. Der amerikanische Zuckerersatzstoff-Hersteller Nutrasweet hatte scheinbar einige Monate vor Projektbeginn in Zusammenarbeit mit der Firma G.D. Searle und der Universität von Wisconsin ebenfalls ein Projekt zur Isolierung eines Süßrezeptors begonnen, wobei in ihrem Falle nach dem Rezeptor für Guanidinium-Verbindungen gesucht wurde.

Aufgrund der inhärenten Unsicherheit über den Erfolg der gewählten Suchstrategie sollte so schnell möglich eine Bewertung stattfinden, so daß eventuell ein alternativer Ansatz zur Identifizierung dieser Geschmacksrezeptoren durchgeführt werden konnte.

### ***V. Zusammenarbeit mit anderen Stellen***

Neben den Projektpartnern konnte auf die molekular- und zellbiologische Erfahrung der Arbeitsgruppe von Prof. Lazdunski am CNRS Institute in Valbonne (Frankreich), die eine der weltweit führenden Gruppen auf diesem Gebiet ist, aufgrund der Kooperation mit Unilever genutzt werden.

In Zusammenarbeit mit dem Primatenzentrum Göttingen konnten Gewebeproben mit gutem Erhaltungsgrad für die mRNA-Isolierung aus Geschmackspapillen von Primaten eingesetzt werden.

Die langjährige Expertise von Prof. B. Lindemann (Physiologie, Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)) auf dem Gebiet der Geschmacksphysiologie war äußerst hilfreich für den Projektentwurf und bei der weiteren Durchführung.

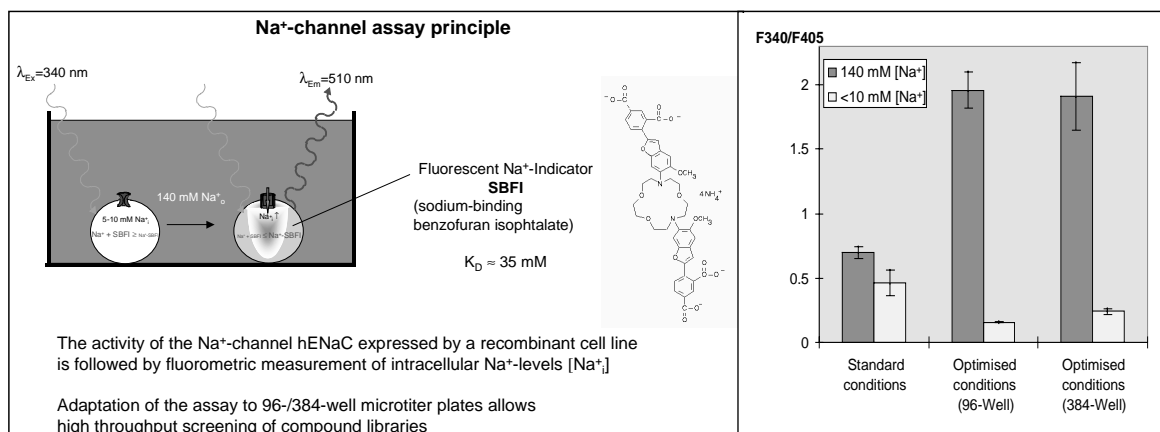
## Ergebnisbericht

### I. Erzieltes Ergebnis

#### I.I. **Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (hENaC) induzieren**

##### I.I.I. **Entwicklung des zellulären Testsystems zur Aktivitätsbestimmung von Na<sup>+</sup>-Kanälen für hohen Probendurchsatz**

Es sind bisher noch keine Testsysteme für kontinuierlich aktive Na<sup>+</sup>-Kanäle beschrieben, die für automatisierte Bestimmungen mit hohem Probendurchsatz einsetzbar wären. Diese experimentelle Hürde konnte aufgrund der vorhandenen Expertise relativ schnell gelöst werden: Es wurde ein Funktionalitätstest für die Bestimmung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals entwickelt und angewendet (Abb.1), der durch Verwendung eines intrazellulären Na<sup>+</sup>-Fluoreszenzindikators eine berührungsfreie Aktivitätsbestimmung ermöglicht.



**Abbildung 1: Wirkungsprinzip (A) und Zuverlässigkeit (B, Minimale (<10 mM Na<sup>+</sup><sub>i</sub>) und maximale (~140 mM Na<sup>+</sup><sub>i</sub>) Na<sup>+</sup>-Signale, bestimmt unter Standard- (Links) und optimierten Bedingungen für 96-Well-Testplatten (Mitte) und 384-Well-Testplatten (Rechts)) des verwendeten Testsystems zur Bestimmung der Na<sup>+</sup>-Kanalaktivität:**

Der Test basiert darauf, daß bei Erhöhung der extrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration der Anstieg des intrazellulären Na<sup>+</sup>-Spiegels abhängt von der Leitfähigkeit der Zellmembran: Eine Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Kanalaktivität resultiert in einem schnelleren und höherem Anstieg des Na<sup>+</sup>-Spiegels, der mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs kontinuierlich gefolgt werden kann (Abb.2).

Nach Optimalisierung des Signal-Rauschverhältnisses erlaubt es dieser Test, selbst geringfügige Unterschiede im zellulären  $\text{Na}^+$ - Spiegel (<5 %) zu detektieren.

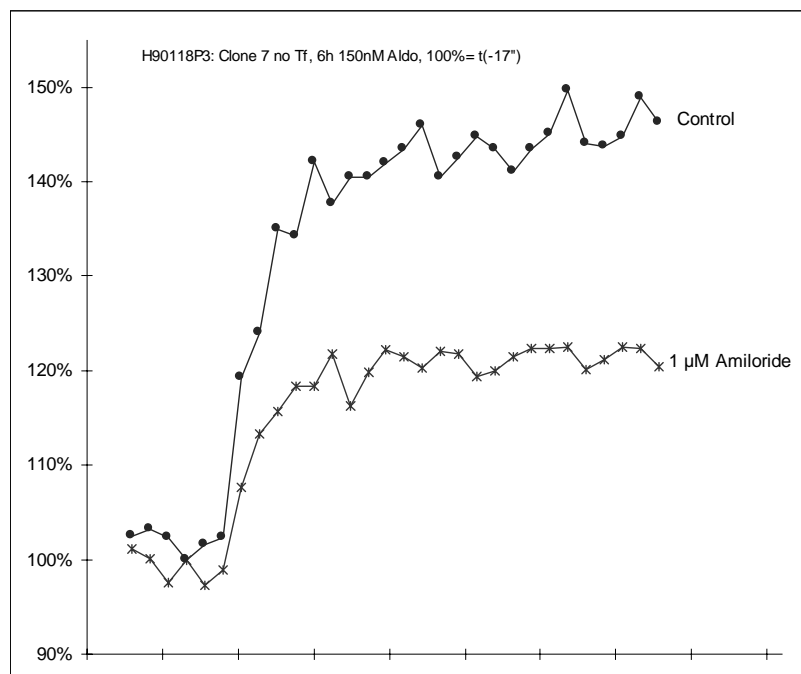
### I.I.II. Verwendung des Tests zur Messung der hENaC-Aktivität

Dieser Test wurde für Zelllinien optimalisiert, die den humanen epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal rekombinant zur Expression bringen. Dazu musste die Expression der Gene für die 3 Untereinheiten in einem funktionellen Komplex erzielt werden.

Es wurden dazu zunächst versucht, dies durch stabile Integration der Gene für die drei Untereinheiten des humanen epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals (hENaC) in das Genom von MDCK-Zellen zu erreichen, wobei die Kanalgene sowie ein Ampicillin-Resistenzgen unter Kontrolle eines CMV-Promoters gestellt wurden. Es konnten rekombinante Zellklone identifiziert werden, die in RTPCR-Analysen ein Vorhandensein aller drei Kanalgene zeigten. Klon 7 war darüberhinaus auch in Northern Blots für alle drei Gene positiv, so daß Klon-7 für alle weiteren funktionellen Analysen verwendet wurde.

Da in ersten Ansätzen mit dem Kanalaktivitäts-Assay eine nur unwesentliche Erhöhung (<20%) des  $\text{Na}^+$ -Einstroms in Klon-7 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen registriert werden konnte, wurde durch Western-Blot Analyse die Expression aller drei Kanaluntereinheiten geprüft. Es zeigte sich dabei, daß die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Untereinheiten eine starke Expression zeigten, während die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit nur ein basales Niveau wie der Wildtyp zeigte. Die eventuelle Toxizität von funktionellen hENaCs als zellulärem  $\text{Na}^+$ -Leck ist scheinbar nicht zu unterdrücken, so daß eine Suppression der  $\alpha$ -hENaC-Expressionsrate vermutlich für die Vitalität der Zellen kritisch ist.

Eine deutliche Verbesserung der ENaC-vermittelten  $\text{Na}^+$ -Einstromrate in Klon-7 gelang durch kurzzeitige Inkubation der Zellen mit Aldosteron bei gleichzeitiger Zugabe des Kanalinhibitors Amilorid zum Zellmedium gelungen (Abb. 2). Es wurde kürzlich deutlich, daß dieses Mineralocorticoid in responsiven Zelltypen die Expression von ENaCs fördert, wobei zur Zeit die Induktion von „Chaperonen“, zur korrekten Proteinfaltung benötigten Proteinkomplexen, als Wirkmechanismus diskutiert wird (May, A., Puoti, A., Gaeggeler, H.-P., Horisberger, J.-D. and Rossier, B. (1997). Early Effect of Aldosterone on the Rate of Synthesis of the Epithelial Sodium Channel Alpha Subunit in A6 Renal Cells. J. Am. Soc. Nephrol. 8, 1813-



1822.).

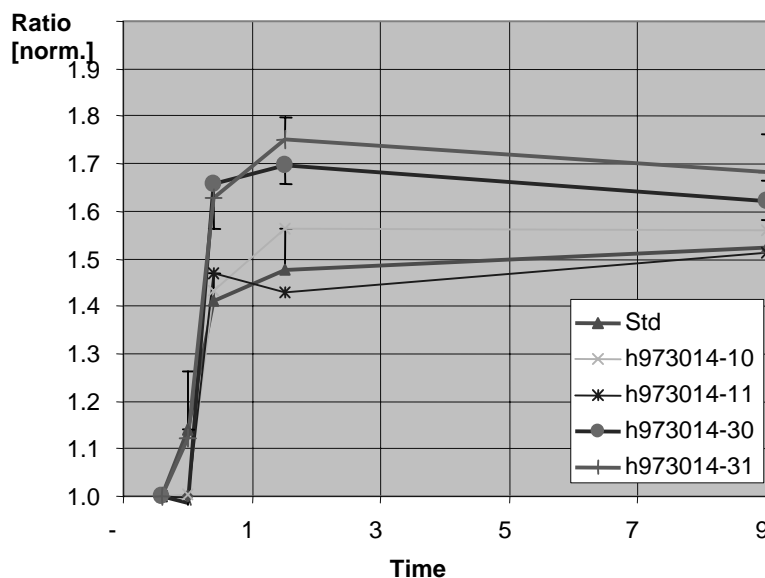
**Abb.2:** Zum Zeitpunkt  $t=0$  wurde die extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 10 mM auf 130 mM erhöht. Dies hat eine drastische Anstieg des intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Spiegels zur Folge. Dieser  $\text{Na}^+$ -Einstrom ist nicht bei Zellen des Wildtyps zu beobachten, außerdem ist er durch Zugabe von

nur 1  $\mu\text{M}$  Amiloride deutlich blockiert.

### I.I.III. Durchmusterung einer Tripeptidbank mit dem hENaC-Aktivitätstest

Dieser Aktivitätstest wurde anschliessend für eine erste Evaluierung des Einflusses von trimeren Peptidbanken auf den hENaC-induzierten  $\text{Na}^+$ -Influx verwendet. Hierzu wurde die Kinetik der evozierten  $\text{Na}^+$ -signale in Mikrotiterplatten registriert, wobei zunächst der Einfluß von potentiell problematischen Peptiden (saure/basische, hydrophobe, bittere oder SH-Gruppen enthaltende Peptide, unterschiedliche Synthesemethoden zur Ermittlung des Einflusses von eventuellen Syntheserückständen, Einfluß des aminoterminalen Glycinrests) im Testsystem ermittelt wurde. Es zeigte sich dabei, daß die Peptide (Gly-)Glu-Glu-Glu und (Gly-)Asp-Asp-Asp zu einer signifikanten Reduktion des  $\text{Na}^+$ -Signals führen. Für die weiteren Tests mußte daher die Pufferkapazität des Testmediums erhöht werden. Zusätzlich wurde der Probendurchsatz optimiert, wobei sich durch einen Wechsel von kinetischer Analyse zu einer 2-Punktmessung der Durchsatz von 60 Proben / h auf 400 Proben / h erhöhte.

Nach dieser Optimierung wurde eine kombinatorische Tripeptidbank von JERINI Biotoools, bestehend aus 8.000 unterschiedlichen Kombinationen, durchgemustert: Jedes Peptid wurde separat in dem zellulären Test auf eine mögliche Beeinflussung der Ionenkanalaktivität geprüft (Bei einem Messfehler von  $\sim 6\%$ , weitere Details sind den Statusberichten zu entnehmen).



**Abb. 3: Identifizierung von modulatorisch wirksamen Peptiden im hENaC-Aktivitätstest. Zugabe von 31 mM  $\text{Na}^+$  für  $t=0$  min induziert ein intrazelluläres  $\text{Na}^+$ -Signal, dessen Amplitude mit einem internen Platten-Standard (Rot) verglichen wird. Peptide h973014-10 und -11 zeigen keinen signifikanten Effekt, während Peptide -30 und -31 schwach erhöhte  $\text{Na}^+$ -Signale in den Zellen auslösen**

Es konnte kein Peptid mit einem drastischen Effekt auf den  $\text{Na}^+$ -Kanal ( $>30\%$  Aktivitätsveränderung) identifiziert werden, 162 Peptide zeigten jedoch einen geringen stimulatorischen Effekt (12-30%), während 326 Testpeptide zu einer Verringerung des zellulären  $\text{Na}^+$ -Einstroms führten.

### I.I.IV. Optimierungsansätze zur Stabilisierung der hENaC-Expression

Während der weiteren Charakterisierung dieser Peptide zeigte sich, daß die Kanalexpression in der verwendeten Zelllinie im Laufe der Kultivierungsdauer verringert hatte, was die weitere Nutzung im Funktionstest unmöglich machte. Es konnte dabei gezeigt werden, daß die kontinuierliche Expression der Na<sup>+</sup>-Kanäle einen Wachstumsnachteil für die Säugerzelle darstellt. Daher wurden zunächst Zelllinien mit induzierbarer Kanalexpression generiert und anschliessend im Funktionstest geprüft.

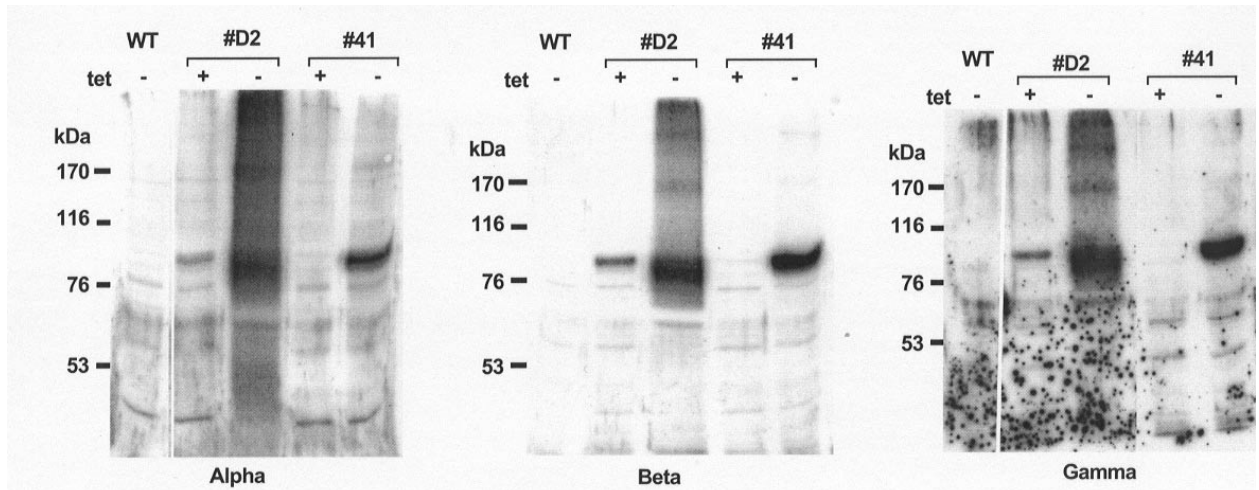
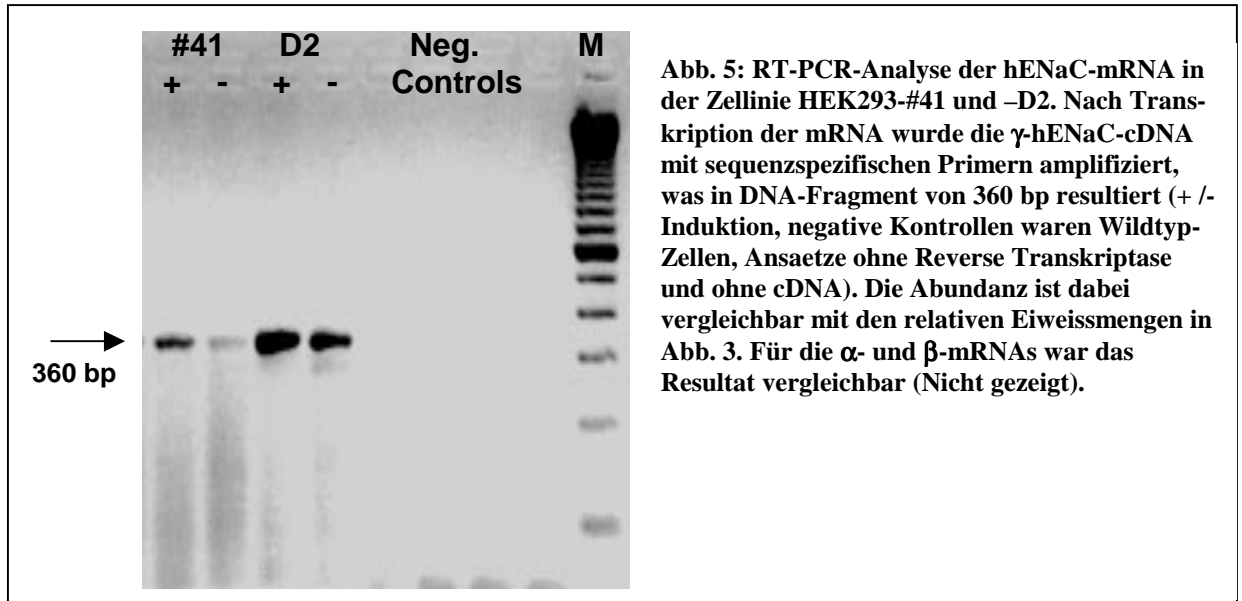
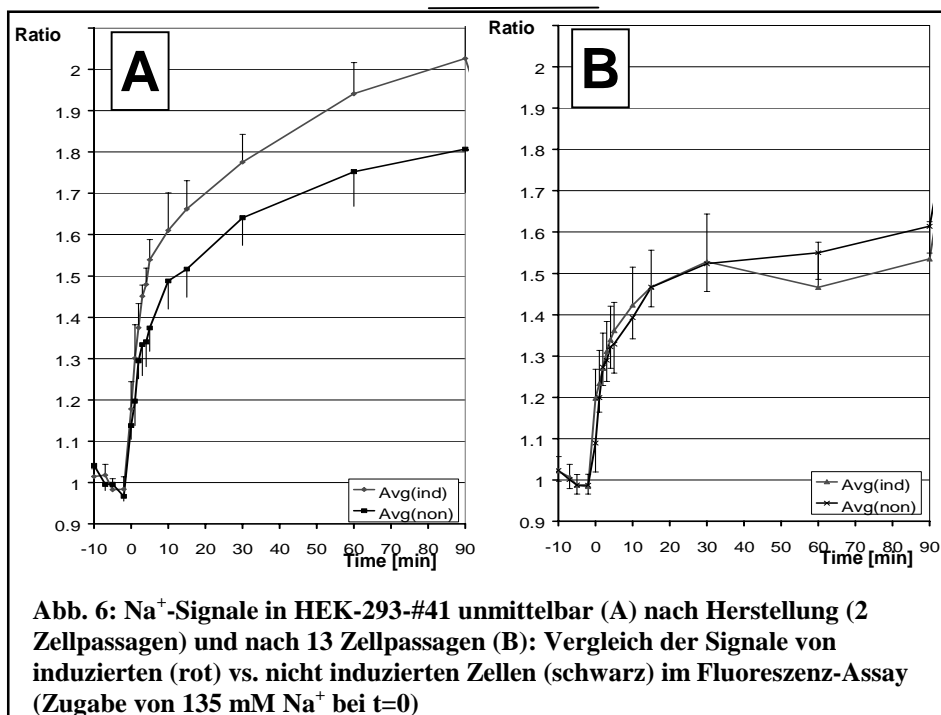


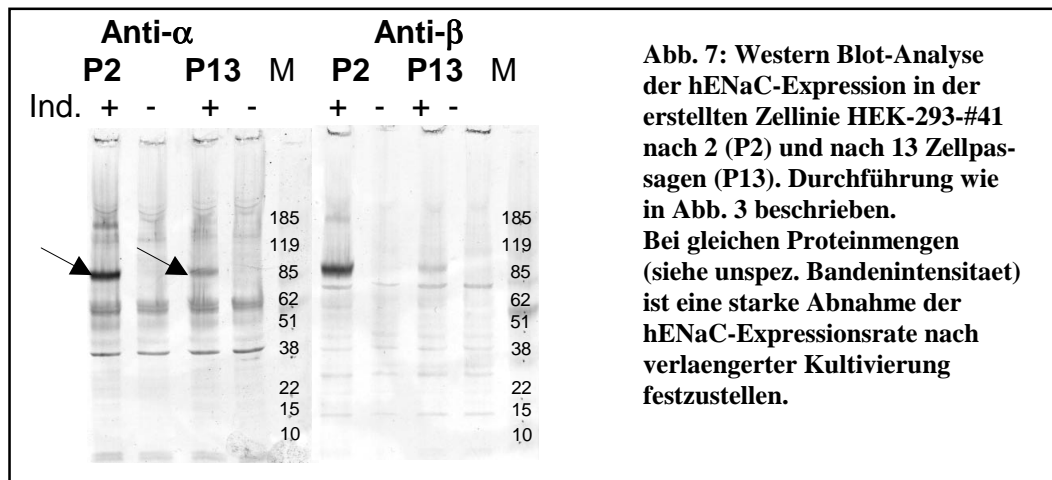
Abb. 4. Western blot analyse der hENaC-Expression in HEK-293-#41, HEK-293-#D2 und HEK-293-Wildtyp (WT). Direct nach stabiler integration wurden die Zellen mit und ohne Induktionsmedium (Tet) kultiviert und Eiweissproben hergestellt. Nach SDS-Gelelektrophorese wurden die hENaC Untereinheiten mit Hilfe spezifischer polyklonaler Seren detektiert und mit Chemilumineszenz als ~90 kDa-Bande visualisiert. Der Klon HEK-293-#D2 zeigt dabei sehr starke Expression, jedoch auch ohne Induktion, waehrend bei HEK-293-#41 nur bei laengerer Entwicklung Hintergrundexpression feststellbar war (nicht gezeigt).

Es konnten dabei 2 Zelllinien (HEK-293-#D1 und #46) hergestellt werden, die auf RNA- und Eiweiß-Niveau eine starke Expression der 3 Kanaluntereinheiten zeigten (Abbildungen 4 und 5) und auch im Funktionstest 30-50% über dem Basalniveau liegende Na<sup>+</sup>-Fluxraten in verschiedenen Funktionstests (elektrophysiologisch (Literatur), <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>-Aufnahme (Literatur) und Na<sup>+</sup>-Signal (Siehe oben)) aufweisen.



Auch bei diesen Zelllinien war jedoch eine starke Abnahme der Kanalexpression nach längerer Kultivierungszeit festzustellen (Abbildungen 6 und 7), was vermutlich ebenfalls auf die Toxizität einer detektierbaren kontinuierlichen  $\text{Na}^+$ -Kanalexpression zurückzuführen ist.





Da für einen robusten HTS (‘High Throughput Screening’)-tauglichen Kanalfunktionstest die Langzeitstabilität gesichert sein muss, wurde aufgrund dieser Instabilität der  $\text{Na}^+$ -Kanalexpression daher versucht, ein Testsystem mit der Hilfe von transient exprimierten  $\text{Na}^+$ -Kanälen in Säugerzellen zu erzielen. Dieser Ansatz wurde für verschiedene Expressionsplasmide, verschiedene Transfektionsmethoden und mit unterschiedlichen Zelllinien geprüft. Auch hier zeigte sich deutlich, daß bei starker funktioneller Expression dieses Kanals die Zellen absterben und unbrauchbar werden. Bei einer zu niedrigen Expressionsrate ist jedoch die Zuverlässigkeit des Testsystems nicht ausreichend genug, um die spezifische Kanalaktivität über die basalen  $\text{Na}^+$ -Einstromrate hinaus detektieren zu können.

Zur Zeit wird daher versucht, dieses Ziel durch Verwendung von Insektenzelllinien zu erreichen, da diese Zellen auch in  $\text{Na}^+$ -armen Kulturmedien kultiviert werden können. Es ist daher zu erwarten, daß diese Zellen durch starke Expression von  $\text{Na}^+$ -Kanälen nicht in ihrer Vitalität beeinflusst werden.

Parallel dazu werden die identifizierten 488 Peptide in (zeitaufwendigeren) sensorischen Studien innerhalb des Unilever-Forschungslabors auf ihre Geschmackswirkung getestet.



## **I.II. Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden**

### **I.II.I. Universität Stuttgart-Hohenheim: Expressionsklonierung eines Thaumatinrezeptorgens**

#### **I.II.I.I. Construction of the cDNA library**

Out of 5 tongues of the Thaumatin-sensitive *Macacus mulattus*, 420 mg tissue of foliate taste papillae were prepared. The subsequent isolation of poly-A+ RNA resulted in 18 µg mRNA. After the synthesis of cDNA, the quality of the material was checked by radioactive labeling and the PCR amplification of marker genes. It showed that the synthesized cDNAs have an average size of 1,5 to 2 kb and range up to 5 kb. With PCR, amplification of 5'-ends of 6kb transcripts was possible, indicating the high quality of the cDNA.

From the foliate mRNA, a cDNA library was constructed in the  $\lambda$  ZAP express vector (Stratagene). The library was size-fractionated in 3 fractions: F1 corresponds to large size cDNA, (> 1,5 – 2 kb) and contained 55.000 independent clones, F2 to medium size cDNA (1 – 1,5 bp) with 90.000 clones and F3 to small size cDNA (<1 kb) with 70.000 independent clone.

From the  $\lambda$  ZAP phages, the eucaryotic expression plasmids pBK-CMV were excised and subdivided in pools of ~ 2000 independent clones. Plasmids of each pool were amplified and prepared in Midi-scale. Fraction F1 resulted in 26 pools, F2 in 44 and F3 in 32 pools.

#### **I.II.I.II. Expression screening**

##### Establishment of the screening assay: Cell lines and transfection

As a first step to identify a suitable cell line for the expression of the pBK-CMV library, the transfection efficiency of the plasmids via electroporation was tested and optimized.

Using a standard EP protocol, 9 µg of plasmid was cotransfected with 1 µg of a pCMV-sport- $\beta$ gal plasmid (GibcoBRL) which allowed the identification of transfected cells in a color reaction.

Tested cell lines were LLC-PK1, HEK293 and two different batches of CHO-K1 cells. Each cell line was transfected with wildtype and recombinant pBK-CMV and as control Bluescript SK II+. For each cell line, electroporation conditions were optimized to give maximum EP efficiency. Best results were obtained when the time constant  $\tau$  was in the range of 35 - 50 ms. Under these conditions, CHO cells show a significantly higher level of transfection than LLC-PK1 and HEK293 cells (CHO: 20% - 50%; LLC-PK1: 5% - 10%; HEK293:  $\leq$  5%). Thus, CHO cells showed a transfection efficiency that guarantees a sufficient expression of proteins encoded by the recombinant plasmids and appeared most suitable for the expression screening.

A critical point was, that even when the CHO cells were treated during the electroporation under identical conditions, variations between 20% and 50% were observed. Only the cells of one EP-round (normally 16 pools) showed a similar transformation efficiency. Thus, it seems important that only 16 batches of transfected cells could be directly compared in the subsequent binding assay. In around 5% of the EPs, a high portion of the cells were destroyed by the electrical pulse. In these cases, the EP efficiency was still high, but the overall number of surviving cells in the wells were rather low. These EPs were characterized by a time constant  $\tau > 50$  ms.

#### Cell culture conditions after EP

To obtain the maximum signal after the incubation with the radioactive ligand, it was necessary that a high number of transfected cells are employed in the binding assay. This task was achieved when 1/3 of the 5 Mio cells that were employed in an EP reaction were transformed to 24 well cell culture plates. After 6 h, the medium containing dead cells was replaced by new medium, leaving a confluent monolayer of adherent CHO cells at the bottom of the plates (~ 500.000 cells). After 24 h, cells were employed in the binding assay.

#### Binding assay

Since the supernatant contains nonadherent, dead cells after 24 h, cells were washed once with PBS at room temperature. After the washing, cells were incubated for 30 min at room temperature with the ligand. The ligand for the screening was labeled by Amersham. 6,25  $\mu\text{g}$  (300pmol) labeled Protein were supplied with a specific activity of 16  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  Protein. The amount of ligand in each well was limited by the small amount of I-125 Thaumatin. It was the next step to determine which ligand concentration would be sufficient to generate a signal that could be detected. When the transfected cells were covered with 150  $\mu\text{l}$  PBS containing 5 nM Thaumatin, a clear I-125 signal could be detected when measured for 1000 sec in a gamma-counter. After incubation with the ligand, the Thaumatin solution was removed and cells immediately washed twice with PBS. Cells were removed with Trypsin and transferred to the counter.

The first experiments were done with Nunclone multidishes. In control experiments employing unlabeled Thaumatin, no difference in the density of the cells could be observed before or after the incubation and the additional washing steps. During the first screening of the F1 fractions of the pBK-cMV library, it was recognized that the cell solutions, which are finally measured in the counter, differ in the amount of cellular particles. Performing additional experiments with unlabeled ligand, it turned out that the cells were not equally fixed to the bottom of the wells. In some cases, almost all cells were removed during the incubation or the washing steps. Since the ligand seemed to bind unspecific to the plastic of the multiwell dishes when the surface was not covered with cells, these approaches lead to false positive signals. In order to ensure that no cells were lost during the screening procedure, different multiwell dishes from additional suppliers were tested for their ability to fix the cells until the end of the experiment. The best results were obtained with Collagen-coated dishes from Falcon. Employing these dishes in the binding assay, a confluent cellular layer was observed even after 3 additional washing steps. Furthermore, the unspecific binding of Thaumatin to the plastic was not affected.

### I.II.III. Screening results

#### First round of screening

Employing the pBK-CMV library in the binding assay, the peak integrals at 27,6 keV (I-125 peak) ranged between 9.000 and 40.000. Among experiments performed at different days and therefore with different charges of CHO cells, the basal level of the peak integral was different. In order to judge the quality of a signal, it was important not only to compare the quantity of the peak integral, but also to compare the time constant of the EP ( $\tau > 50$  results in high unspecific signals) and the percentage of transfection (EP-efficiency). To control the EP-efficiency of every pool, a similar amount of transfected cells was analysed on a second multiwell dish with a  $\beta$ -gal staining. Counting the number of labeled cells in comparison to nonlabeled cells gave an estimation about the EP-efficiency.

Pools were charged as positive when  $\tau$  and the EP-efficiency did not differ from the pools treated within the same EP, but the I-125 peak integral was significantly above the average basal level. All 102 pools were tested and verified 2 to 3 times in independent experiments. From each fraction, two pools showing the most significant and reproducible increase of Thaumatin binding were chosen for further analysis (F1-3; F1-12; F2-14; F2-41; F3-13; F3-15). These pools were transfected into E. coli and subdivided in fractions of 300 cfu to 500 cfu. The overall number of colonies was ~8000, so that a statistical representation of the original 2000 clones of each initial pool was guaranteed. A filter replica of the plated fractions was taken in order to allow a fast decrease of the pool sizes in further screening steps. The bacteria were rescued from the master plates and the recombinant plasmids isolated in midi scale.

Prepared pools:	F1-3:	20 pools of 400 cfu
	F1-12:	20 pools of 400 cfu
	F2-14:	20 pools of 400 cfu
	F2-41:	15 pools of 500 cfu
	F3-13:	23 pools of 300 cfu
	F3-15:	20 pools of 400 cfu

The transfection of CHO cells and the subsequent binding assay was performed as in the initial screening circle, with concentrations of radiolabeled Thaumatin in the incubation buffer ranging between 2 and 5 nM, depending on the activity of the isotope. It was expected that the signal to noise ratio should significantly increase in some of the fractions compared to the signals obtained with the original plasmid pools, as the dilution of plasmid harvesting a putative Thaumatin binding protein was decreased from 1/2000 to 1/300-500. Such a significant increase could not be observed. Nevertheless, individual pools showed differences in the amount of bound Thaumatin up to 100%. Therefore, the pool with the best signal to noise ratio (F1-12/13) was chosen for further subdivision and analysis. The filter copy of the F1-12 plate was cut in 12 pieces, each containing around 35 individual colonies. The plasmids of the bacteria colonies were isolated and checked for their ability to induce a Thaumatin binding in CHO cells. Parallel, the 20 F1-12 pools were analysed a second time to verify the signal obtained in the first experiments.

The results of these experiments indicate that the signals recognized in the first and second screening cycle might represent variations of the nonspecific background; the positive signal obtained with the F1-12/13 fraction in the first experiment was not

visible in the second experiment and furthermore, the signals obtained with the 12 subdivided F1-12/13 fractions were almost similar.

#### Second round of screening

We started to optimize the binding assay in order to find out where the nonspecific binding of the radiolabeled Thaumatin occurs and how the background can be lowered at a constant level without affecting a specific interaction with putative Thaumatin binding sites.

Test-EPs under identical conditions revealed that even when the cell number, the fitness (monitored by the morphology of the cells) and the transfection efficiency was almost identical, the amount of labeled Thaumatin bound to the cells showed significant variations. Although electroporation is a widely accepted and established method to transfect recombinant Dna in CHO cells for subsequent binding studies, these results indicate that the electroporation changed the metabolism of the transfected cells, resulting in a different amount of possible Thaumatin-binding sites on the surface of the cells. It was concluded that these effects were due to the strong electric impulse and therefore electroporation was changed as not to be suitable for the transfection of plasmids when a subsequent binding-assay with radiolabeled Thaumatin should be performed.

Therefore, in each well of a 24 well multidish, a confluent monolayer of an identical number of 2 million CHO cells were raised. Different chemical approaches for the transfection of the cells were tested (Lipofectin, Lipofectamin, Cellfectin, DMRIE-C, Effectene, CLONfectine). Best results were obtained by transfecting CHO cells with Lipofectamin (Gibco-BRL). In this case, up to 40%-50% of the 2 mio cells could be transfected. Number of surviving cells and transfection rates were very stable.

Transfected cells showed the typical shape of intact CHO cells. Expression of recombinant proteins was demonstrated by transfection of a recombinant pBK-CMV-GFP construct, leading to the expression of recombinant Green Fluorescence Protein, which could be visualized *in vivo* by fluorescence microscopy of the transfected cells. Furthermore, the binding assay was optimized to reduce possible nonspecific binding of Thaumatin to the surface of the multiwell dish. Employing 2 mg/ml BSA in the assay- as well as the washing buffer reduced the binding of Thaumatin to the plastic surface.

These optimized conditions for the transfection and the binding assay were employed in a second screening of the complete library. It showed that under these conditions, the nonspecific background could be reduced and stabilized. Each pool was transfected 2 times in independent experiments. Out of the 102 pools tested, the two showing the most significant reproducible increase in the induced Thaumatin binding (30% increase induced by F2-3, F2-12) were subjected to the second screening cycle. Pool F2-3 was splitted in 23, F2-12 in 26 subpools. All subpools were prepared twice to avoid that putative positive clones could be lost in the splitted representations of the original pool and the plasmids employed in the optimized transfection and binding assay as described for the first screening procedure above. It showed that the expected increase in Thaumatin binding could not be induced by any of the pools. In fact, the variations obtained with the subdivided fractions of the original pools were in the same range as observed with the original, not subdivided pools.

**I.II.IV. Conclusions**

From the results obtained in the screening experiments, it was concluded that even under optimized screening conditions, the variations of the nonspecific background was in the range of approximately 30% of the average. As the expected size of a signal induced by one positive clone out of a pool of 2000 would be expected in a range smaller than the background variations, the signal to noise ratio obtained in this experimental approach seems to be in a range which excludes the successful identification of cDNA clones encoding Thaumatin-binding sweet receptors.

### I.II.II. JERINI Biotools: Konstruktion eines Hefestammes zur Identifizierung und Klonierung des Süß-Rezeptors von Geschmackssinneszellen

#### I.II.II.I. Zielsetzung dieses Teilvorhabens

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines Hefestammes, der die funktionale Kopplung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) aus Säugetieren an ein hefeeigenes Reportersystem ermöglicht. Die Expression einer Säuger-cDNA Bank aus Zungengewebe in diesem Hefestamm sollte anschließend die Identifizierung des putativen Süßrezeptors ermöglichen.

Darauf folgend sollten die von Jerini BioTools produzierten kombinatorischen Substanzbibliotheken in Verbindung mit einer Süßrezeptor-Reporterhefe, die Suche nach neuen Liganden des Süßrezeptors in einem Massen-Screeningsystem (High-Throughput-Screening-System) vereinfachen und beschleunigen.

#### I.II.II.II. Der Lebenszyklus von Hefe

Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) sind Eukaryonten mit einem Lebenszyklus, der sie für die Expression und funktionale Kopplung von Säugerzell-GPCRs besonders geeignet macht. Im folgenden wird daher der Lebenszyklus von Hefe kurz vorgestellt. Hefen können in einem von zwei unterschiedlichen haploiden Paarungstypen vorkommen, die als **a**- und  $\alpha$ -Typ (MATa bzw. MAT $\alpha$ ) bezeichnet werden. Zwei Zellen der beiden Typen paaren sich (Mating) und bilden eine diploide Zelle (MATa/MAT $\alpha$ ). Abgestimmt wird der Mating-Vorgang durch die Freisetzung von Pheromonen, kleinen Peptidhormonen, die beide Partner in die Umgebung abgeben. Empfängt die Zelle ein Pheromonsignal, so wird eine Serie von Ereignissen ausgelöst, die das Mating einleiten. Dazu gehören Veränderung der Zellform, Aktivierung von matingspezifischen Genen und Einstellung des Zellwachstums. Das Ergebnis des Matings ist die Bildung einer Zygote, aus der eine diploide Hefezelle hervorgeht, die sich bei ausreichendem Nährstoffangebot mitotisch vermehrt. Verschlechtern sich die Wachstumsbedingungen, insbesondere bei Stickstoffmangel, so tritt eine Zellteilung durch Meiose ein und es werden vier Sporen (Ascus) gebildet. Herrschen wieder gute Wachstumsbedingungen, so kann sich aus jeder Spore durch mitotische Teilung

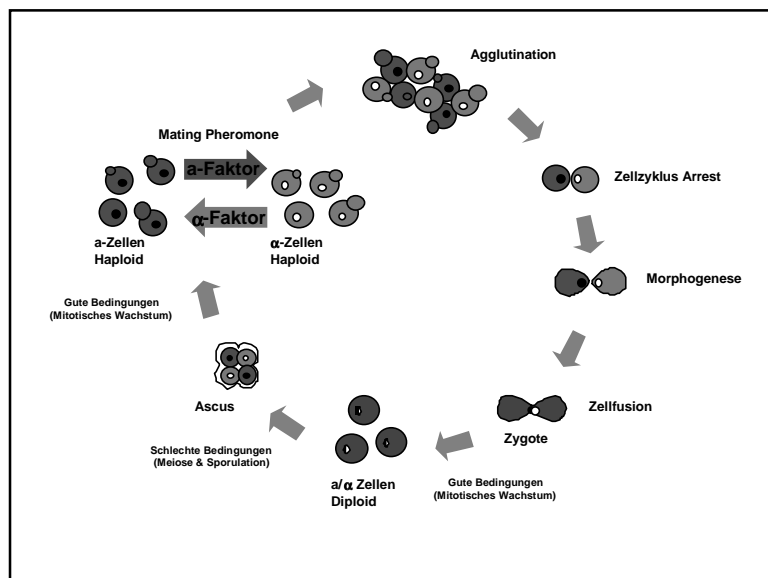


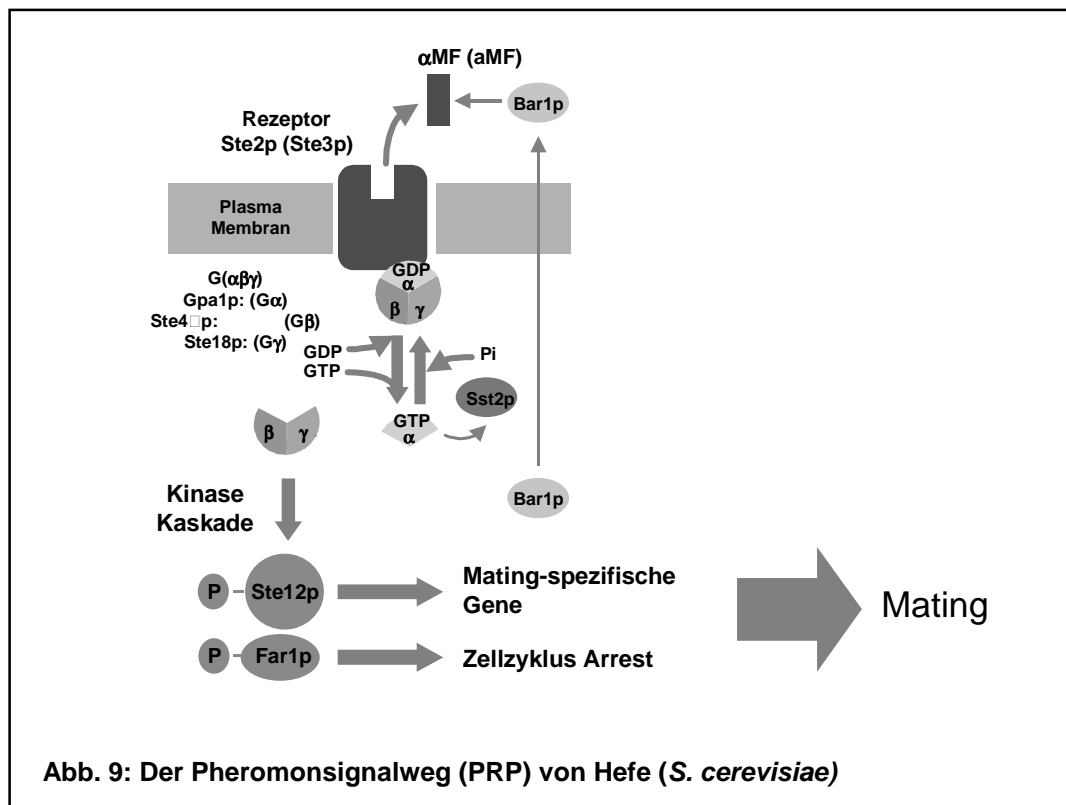
Abb.8: Lebenszyklus von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

eine Kolonie haploider Zellen bilden. Es fusionieren stets nur Zellen entgegengesetzten Mating-Typs (Abb. 8).

### I.II.II.III. Der Pheromonsignalweg von Hefe

Hefe-Pheromone wirken durch spezifische Rezeptorproteine, die von den Genen STE2 und STE3 codiert werden und die sich jeweils in der Plasmamembran von **a**- beziehungsweise  $\alpha$ -Zellen befinden. Die Signalübertragung wird durch Bindung der Mating-Pheromone ( $\alpha$ MF bzw. **a**MF) an ihre Rezeptoren (Ste2p bzw. Ste3p) eingeleitet. Eine, an das Bindungsereignis geknüpfte, Konformationsänderung des Rezeptors wird als Signal an die Innenseite der Membran an ein nachgeschaltetes heterotrimeres G-Protein ( $G\alpha\beta\gamma$ ) weitergegeben, das von den Genen GPA1 ( $G\alpha$ ), STE4 ( $G\beta$ ) und STE18 ( $G\gamma$ ) codiert wird. Der Rezeptor des **a**- bzw.  $\alpha$ MF sind an das gleiche heterotrimere G-Protein gekoppelt. Das  $G\alpha$ -Protein wird in diesem Prozeß durch Austausch des GDP gegen GTP aktiviert und dissoziiert von der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit ( $G\alpha\cdot GDP \Rightarrow G\alpha\cdot GTP$ ). Die freigesetzte  $G\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert anschließend eine Protein-Kinase-Kaskade. Am Ende dieses Pheromon-Transduktionswegs (PRP) werden unter anderem die, von STE12 und FUS3 codierten, Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Als Reaktion auf die Phosphorylierung steigert Ste12p seine Aktivität. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung matingspezifischer Gene. Die Synchronisation der Zellzyklen der Mating-Partner wird durch die Phosphorylierung von Far1p ermöglicht. Im phosphorylierten Zustand bindet Fus3p an cyclinabhängige Kinasen und bewirkt dadurch einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase (Abb.9).

Die Abschwächung der Signalübertragung des PRPs (Desensitivierung) am Ende des Mating-Prozesses wird, neben der Endocytose des Pheromon-Rezeptors, durch



Expression und Sezernierung einer von BAR1 codierten Protease ermöglicht. Diese baut den  $\alpha$ MF extrazellulär ab. Ein weiteres für die Desensitivierung wichtiges Protein ist Sst2p, das durch seine Interaktion mit Gpa1p dessen intrinsische GTPase-Aktivität verstärkt. In der inaktiven, GDP-gebundenen Form, hat GPA1 eine hohe Affinität zum  $G\beta\gamma$ -Komplex und assoziiert mit diesem, wodurch der  $G\beta\gamma$ -Komplex in seinen heterotrimeren Grundzustand  $G(\alpha\beta\gamma)$  überführt wird (Abb. 9).

Die am PRP beteiligten Komponenten sind, bis auf die Phermomon-Rezeptoren, im wesentlichen in beiden Paarungstypen identisch und strukturell mit den entsprechenden GPCR-vermittelten Regulationswegen in Säugetierzellen verwandt. Im Gegensatz zu Säugerzellen, bei denen eine Vielzahl unterschiedlicher GPCRs mit verschiedenen G-Proteinen interagieren können, ist der PRP in Hefe einzigartig und daher sehr spezifisch.

#### I.II.IV. Herstellung eines gentechnisch veränderten Hefestammes zur Visualisierung der Kopplung eines GPCRs an den PRP

Die Etablierung eines *in vivo*-Screeningsystems in Hefe, zur Isolierung neuer Liganden von GPCRs, erforderte die Expression eines ausgewählten GPCRs, sowie dessen Kopplung an den PRP. Die Aktivierung des PRPs sollte durch ein geeignetes Reporter-system sichtbar gemacht werden. Die meisten Säugerzell-GPCRs koppeln nicht an den PRP der Hefe. Mehrere Modifikationen in den Genen des PRPs sollen diese Wechselwirkung herstellen. Weitere Veränderungen sollen zusätzlich die Sensitivität des PRPs erhöhen und damit eine effizientere Expression von Reportergenen gewährleisten. Die Auswirkungen dieser Veränderungen auf den PRP des Reporterstammes

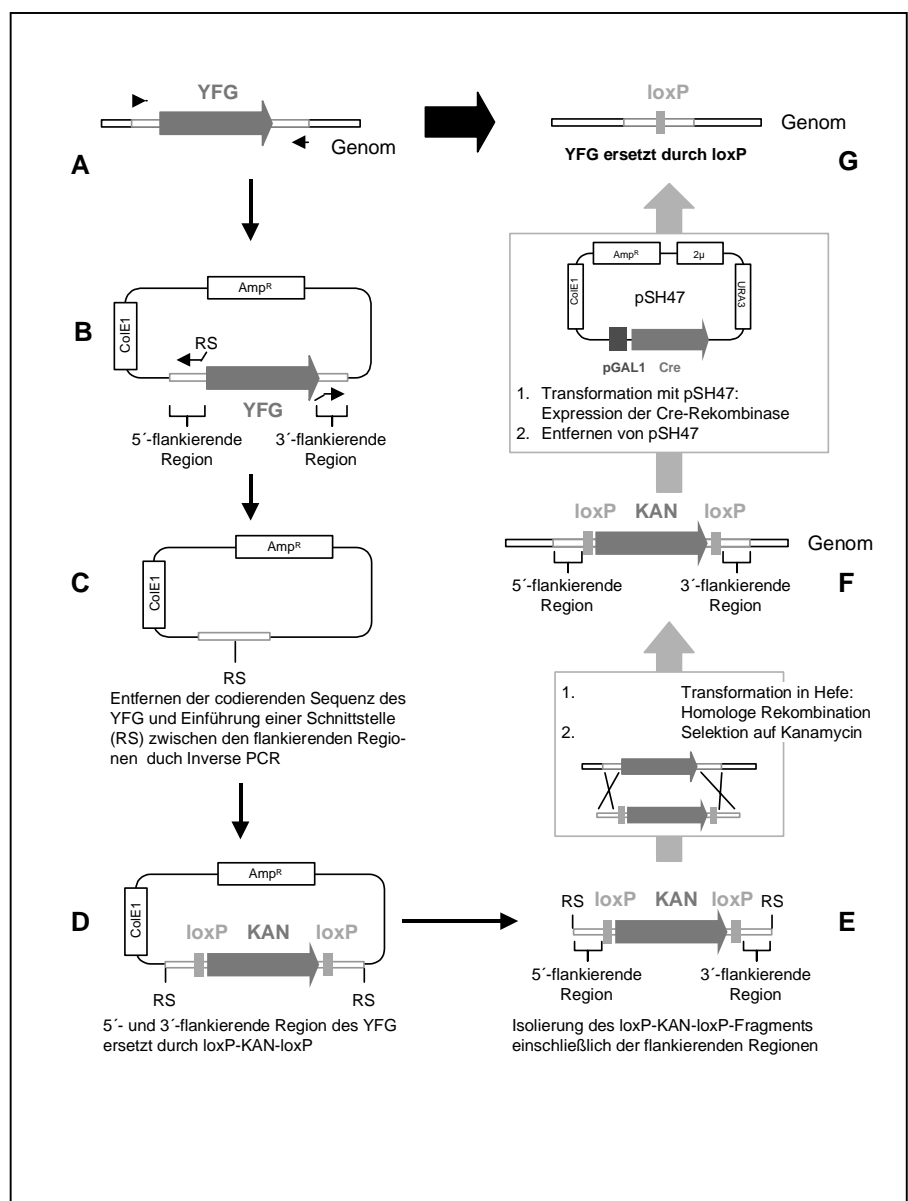


Abb. 10: Deletion von Zielgenen mit Hilfe des Cre-loxP-Systems



wurden anhand der Aktivierung des endogenen Pheromonrezeptors Ste2p untersucht. Anschließend wurde ein Säugerzell-GPCR in diesem Hefestamm exprimiert und seine Kopplung an den PRP getestet.

#### Das Cre-loxP-System und seine Verwendung bei der Modifikation des Genoms der Reporterhefe

Alle Modifikationen wurden in dem Hefestamm YPH499 (Genotyp: MAT $\alpha$  ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup> trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1) vorgenommen. YPH499 ist ein gängiger, gut charakterisierter Laborstamm mit Mating-Typ  $\alpha$  und mehreren selektierbaren Markern.

Deletionen (Disruption von Genfunktionen) zur Erhöhung der Sensitivität des PRPs bzw. der Integration von Reporter genen ins Hefegenom wurden, unter Verwendung des Cre-loxP-Systems, in Kombination mit einem heterologen Markergen (Kanamycin-Resistenzgen, KAN), durchgeführt (Abb. 10). Dieses System erlaubt die hocheffiziente homologe Rekombination in den adressierten genomischen Locus. Zur Deletion der weiter unten beschriebenen Gene mit Hilfe des Cre-loxP-Systems wurde das entsprechende Zielgen (YFG) und seine flankierenden Regionen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zunächst kloniert. Im nächsten Schritt wurde durch eine inverse PCR (IPCR) zwischen der 5'- und 3'-flankierenden Region eine Restriktionsschnittstelle (RS) eingeführt und gleichzeitig der offene Leserahmen (ORF) des Zielgens deletiert (Abb.10 A-D).

Nach Einsetzen der loxP-KAN-loxP-Kassette in die Restriktionsschnittstelle, wurde das Disruptionskonstrukt (5'-loxP-KAN-loxP-3') in Hefe transformiert und die homologe Rekombination in den Locus des Zielgens durch die flankierenden Regionen ermöglicht. Das Ergebnis war eine Deletion des Zielgens, bei gleichzeitiger Integration des KAN-Markers (Abb. 10 E-F).

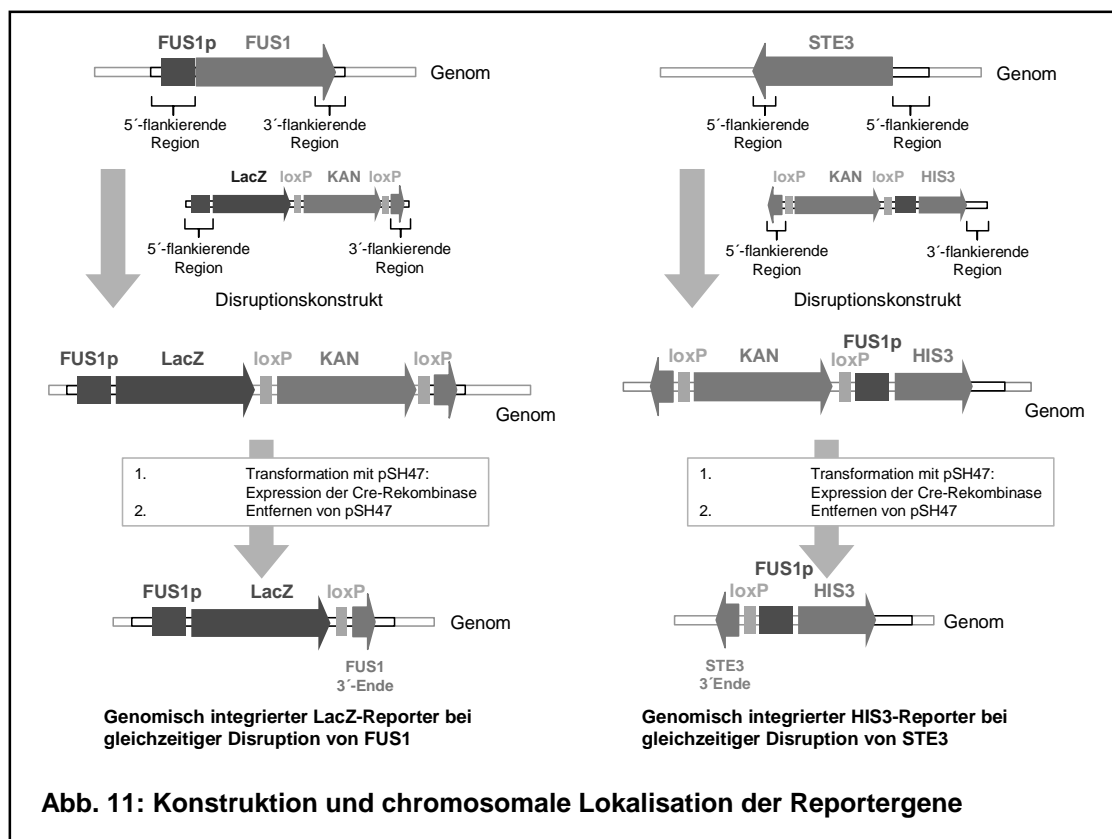
Nach Selektion auf kanamycinhaltigen Medium wurde in diese Hefen ein Cre-Rekombinase-codierendes Plasmid (pSH47) transformiert und auf galaktosehaltigen Medium wachsen lassen. Dabei wird die Cre-Rekombinase exprimiert und eine Rekombination zwischen den beiden loxP-Sequenzen induziert, wodurch der Kan-Marker aus dem Genom entfernt wird. Anschließend wurde das pSH47-Plasmid durch Selektion auf 5-FOA-haltigen Medium wieder entfernt. Zurück bleibt eine einzelne loxP-Sequenz am chromosomalen Locus des Zielgens (Abb. 10 G). Die so entstandenen Hefen waren wieder kanamycinsensitiv und wurden zur Deletion des nächsten Zielgens verwendet. Die korrekte Lokalisation aller vorgenommenen Deletionen wurde jeweils über eine diagnostische PCR nachgewiesen.

#### Konstruktion von STE12p-abhängigen Reporterkonstrukten

Zur Visualisierung der G-Protein vermittelten Aktivierung des PRPs, wurden zunächst Reporterkonstrukte auf Basis des bakteriellen LacZ-Gens ( $\beta$ -Galactosidase) und des Hefe-HIS3-Gens (Imidazol-Glycerinphosphat-Dehydratase) konstruiert (FUS1p-LacZ bzw. FUS1p-HIS3). In beiden Fällen befindet sich das Reporter gen unter Kontrolle des STE12p-abhängigen FUS1-Promotors. Bei FUS1 handelt es sich um ein mating-spezifisches Gen, dessen Expression bei Aktivierung des PRPs um einen Faktor 10 bis 100 verstärkt wird. Von einer entsprechenden Verstärkung der FUS1p-regulierten Reporter gene konnte daher ausgegangen werden.

Die transkriptionelle Fusion der Kontrollelemente von FUS1 mit den codierenden Regionen von LacZ und HIS3 führte, bei PRP-Aktivierung zu einer Induktion des FUS1-Promotors und zu einer verstärkten Expression der  $\beta$ -Galactosidase und der

Imidazol-Glycerinphosphat-Dehydratase. Die Expression von LacZ konnte, durch die Zugabe eines chromogenen Substrats 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-GAL) ins Medium, über die Blaufärbung der Reporterhefe sichtbar gemacht werden. Die Expression des HIS3-Gens komplementierte einen Wachstumsdefekt (*his3- $\Delta$ 200*) von YPH499, indem es diesen Hefen erlaubte auf histidinfreiem Medium zu wachsen. Um eine einfachere Handhabung der Hefen mit diesen Reporterkonstrukten zu ermöglichen, wurden beide Reportergene mit Hilfe des Cre-loxP-Systems in das Genom der Ausgangshefe YPH499 integriert (Genotyp: MATa *ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup> trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1  $\Delta$ fus1[FUS1p-LacZ]  $\Delta$ ste3[FU1p-HIS3]) [Abb. 4]. Ausgehend von diesem Hefestamm, wurden alle im nächsten Abschnitt weiter unten aufgeführten genomischen Modifikationen vorgenommen.*



Alle Reportergenassays wurden als Agardiffusions-Assays in histidinfreiem, X-Gal-haltigen Standardmedium durchgeführt. Das Medium wurde dazu mit flüssigem Agar versetzt und auf 45–50°C im Wasserbad abgekühlt. Danach wurde ein Aliquot einer frischen Kultur der zu testenden Reporterhefen zugegeben und die Lösung in eine Petrischale gegossen. Nach dem Erstarren des Mediums wurden definierte Mengen des Rezeptorliganden auf ein Celluloseblättchen aufgebracht und auf den Agar gelegt. Reporterhefen konnten unter diesen Bedingungen nur dann wachsen und eine Blaufärbung zeigen, wenn der PRP durch den Agonisten auf dem Celluloseblättchen aktiviert wurde. Da die Rezeptorliganden radial von dem Celluloseblättchen ins Medium diffundierten, konnten die Reporterhefen nur um das Celluloseblättchen wachsen (Abb. 15).

Die FUS1p-abhängigen Reporterkonstrukte ermöglichten damit die Visualisierung der Aktivierung der Pheromon-Transduktionskaskade direkt auf der Agarplatte, da nur Hefen wuchsen und gleichzeitig eine Blaufärbung zeigten, deren Pheromon-Transduktionskaskade aktiviert wurde.

### III.II.V. Erhöhung der Sensitivität des PRPs der Reporterhefe

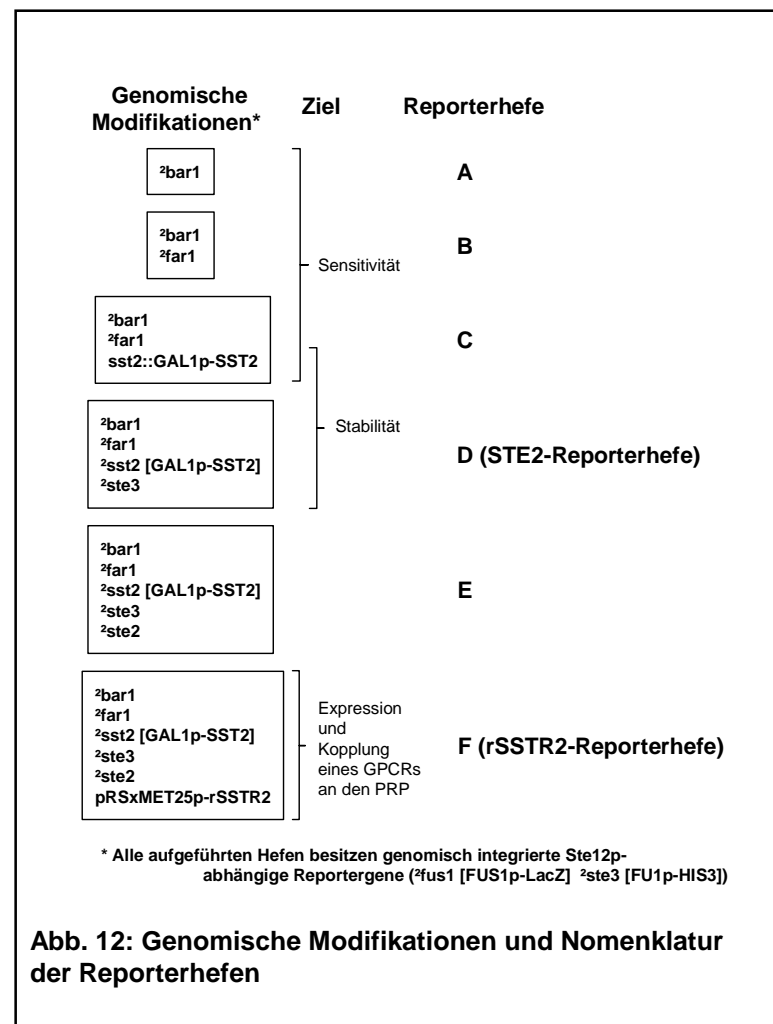
Neben der Integration von Reportergenen, waren weitere Modifikationen im Genom der Reporterhefe notwendig. Ziel dieser Modifikationen war es, die Sensitivität der Pheromon-Transduktionskaskade gegenüber GPCR-Liganden zu erhöhen. Dies sollte durch gezieltes Ausschalten (Deletieren) mehrerer proteincodierender Funktionen des PRPs erreicht werden.

Zunächst wurde die codierende Region von Bar1p deletiert. Die Funktion von BAR1p ist die Desensitivierung der Pheromon-Transduktionskaskade während des Mating-Prozesses durch Proteolyse des  $\alpha$ -Matingfaktors. Da auf der Suche nach neuen Säugerrezeptor-Liganden auch Peptid- und Peptidderivatbibliotheken eingesetzt werden sollen, war es sinnvoll BAR1 zu deletieren ( $\Delta$ bar1) [Abb. 12, Reporterhefe A].

Während des Mating-Prozesses wird ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase induziert. Dieser Effekt wird durch die Expression von FAR1p vermittelt und ist ebenfalls Bestandteil der Pheromon-Transduktionskaskade. Um ein konstantes Wachstum der Reporterhefe und damit eine Visualisierung der Aktivierung des PRPs zu ermöglichen, wurde das Far1p codierende Gen in der Reporterhefe deletiert ( $\Delta$ far1) [Abb. 12, Reporterhefe B].

Sst2p trägt zu einem erheblichen Teil zur Desensitivierung der Pheromonantwort über die Aktivierung der GTPase Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit bei.

Daher war eine beträchtliche Erhöhung der Sensitivität gegenüber  $\alpha$ MF und damit der Expression der Reporter gene, nach der Deletion von SST2, zu erwarten. Zusätzlich zur Disruption der Funktion von FAR1 wurde daher SST2 in der Reporterhefe deletiert ( $\Delta$ sst2).



Alle getesteten Hefestämme mit einer Deletion von SST2 zeigten zunächst die erwartete höhere Sensitivität. Allerdings wurde nach mehrmaligen Kultivieren eine konstitutive Reporter-gen-Aktivität, bzw. eine völlige Insensitivität gegenüber dem  $\alpha$ -Matingfaktor, festgestellt. Außerdem waren alle  $\Delta$ sst2-Hefen, im Vergleich zu Wildtyp-Hefen, im Wachstum verlangsamt und morphologisch anomal. Bei mikroskopischen Untersuchungen wurden bei ungefähr 20 % der Zellen, auch ohne  $\alpha$ -Matingfaktor-Zugabe, eine birnenförmige, verlängerte Morphologie festgestellt.

Die Deletion von SST2 in Hefe verursachte wahrscheinlich einen Mating-Typ-Wechsel der Reporterhefe von **a** nach  $\alpha$  und damit verbunden die Produktion von  $\alpha$ MF (Abb. 13). Das Ergebnis ist eine heterogene Reporterhefe-Population, in der sowohl **a**MF-produzierende als auch  $\alpha$ MF-produzierende Hefen vorkommen. Dies verursachte wahrscheinlich die beobachtete konstitutive Aktivierung der eingeführten Reportergene bzw. die Akkumulation von diploiden Hefen, die eine völlige Insensitivität gegenüber dem  $\alpha$ -Matingfaktor zeigten.

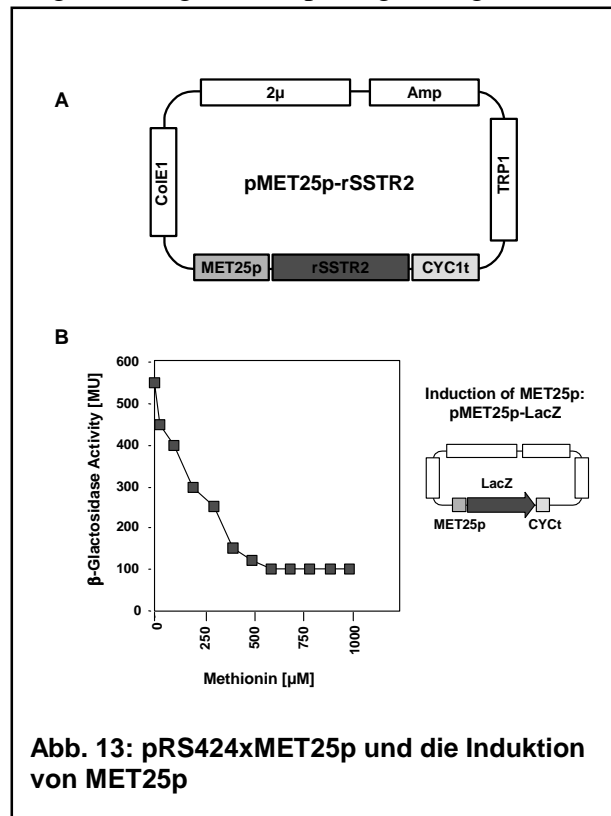
$\Delta$ sst2-Hefen sind nur dann geeignete Reporterhefen, wenn ein Weg gefunden werden kann, der zu einem stabilen Phänotyp führt. Das

sollte durch eine kontrollierte Regulation der Expression von SST2 erreicht werden.

Eine transkriptionelle Fusion von SST2 mit einem GAL-Promotor (GAL1p) wurde kloniert (GAL1p-SST2) und anschließend die genomische Kopie des SST2 gegen Gal1p-SST2 ausgetauscht [Abb. 12, Reporterhefe C]. GAL1p ermöglicht die stringente, regulierte Expression von SST2 in Abhängigkeit des verwendeten Mediums. GAL1p wird nur auf galaktosehaltigen Medium induziert. Auf glucosehaltigen Medium ist die Induktion des Promotors nahezu vollständig reprimiert.

Damit stand ein System zur Verfügung, in dem die Expression von SST2, in Abhängigkeit vom verwendeten Medium, ein- oder abgeschaltet werden konnte. In der relativ kurzen Zeitspanne, in der der PRP aktiviert wird, kann die Sensitivität der Reporterhefe, durch das Ausschalten der SST2-Expression in glukosehaltigen Medium, erhöht werden. Während zur Kultivierung dieser Hefe galaktosehaltiges Medium verwendet wird, um die Expression von SST2 aufrechtzuerhalten.

Zusätzlich zur regulierten Expression von SST2 wurde die codierende Region des **a**MF-Rezeptors (STE3) deletiert ( $\Delta$ ste3) [Abb. 12, Reporterhefe D], um ein Mating-Typ-Wechsel vollständig zu unterbinden. Das Verhalten der Reporterhefe D wurde auf die Reporter-gen-Aktivität, nach Aktivierung des PRPs durch  $\alpha$ MF, in einem Agardiffusions-Assay untersucht (Abb. 15, Reporterhefe D). Hefen dieses Genotyps



wuchsen etwas langsamer als Wildtyp-Hefen, hatten aber eine normale Morphologie und zeigten keine konstitutive Aktivierung der Reportergene. Damit war eine Reporterhefe erzeugt, deren PRP hochsensitiv gegenüber der Exposition von  $\alpha$ MF war und die zugleich einen stabilen Phänotyp zeigte.

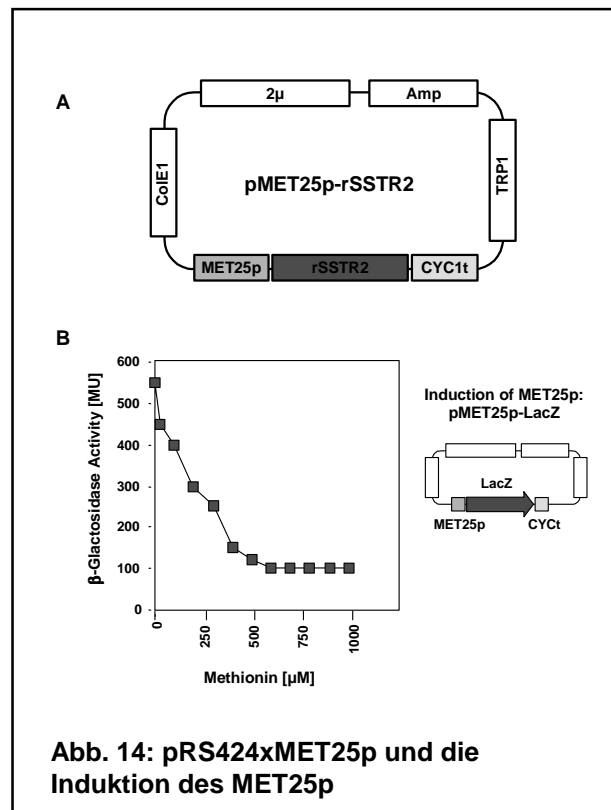
Zur hintergrundfreien Untersuchung heterolog exprimierter Rezeptoren in Hefe, wurde die codierende Region des endogenen  $\alpha$ -MF-Rezeptors (STE2) ebenfalls deletiert [Abb. 12, Reporterhefe E]. Diese Hefe besitzt einen funktionalen, hochsensitiven PRP, der nur bei heterologer Expression eines GPCRs bzw. homologer Expression von STE2, über die Zugabe des entsprechenden Agonisten aktiviert werden kann.

Ausgehend von YPH499 konnte durch die Deletion mehrerer Gene des PRPs eine Reihe von Reporterhefen hergestellt werden, deren Wachstum abhängig von der Expression eines FUS1p-abhängigen HIS3-Reporters war. Zusätzlich wurde durch einen ebenfalls FUS1p-abhängigen LacZ-Reporter eine Blaufärbung hervorgerufen, die die Dokumentation der Ergebnisse stark vereinfachte. Die Sensitivität des PRPs gegenüber  $\alpha$ MF der Reporterhefen nahm dabei mit jeder zusätzlichen Deletion stark zu. Die Instabilität der Hefen nach Deletion von SST2 konnte durch eine GAL1p-abhängige Expression von SST2 verhindert werden. Die zusätzliche Deletion von STE3 hatte einen weiteren stabilisierenden Effekt, da ein eventueller Mating-Typ-Wechsel den PRP von  $\alpha$ -Hefen nicht mehr aktivieren konnte. Die konstitutive Aktivierung des PRPs bzw. Bildung von diploiden Hefen war damit unmöglich.

#### L.II.II.VI. Heterologe Expression und funktionale Kopplung eines Modell-GPCRs an den PRP der Reporterhefe

Die funktionale Kopplung von GPCRs aus höheren eukaryontischen Zellen an den PRP der Reporterhefe wurde zunächst an einem Modellrezeptor getestet. Dazu wurde ein Subtyp des Somatostatin-Rezeptors von *R. norvegicus* (rSSTR2) gewählt. Von rSSTR2 ist bekannt, daß er an das endogene G $\alpha$ -Protein (Gpa1p) der Hefe koppelt. Die cDNA des rSSTR2-Gens wurde dazu aus einer Ratten cDNA-Bank mittels PCR isoliert und die funktionale Expression von rSSTR2 unter der Kontrolle verschiedener Promotoren in der Reporterhefe untersucht.

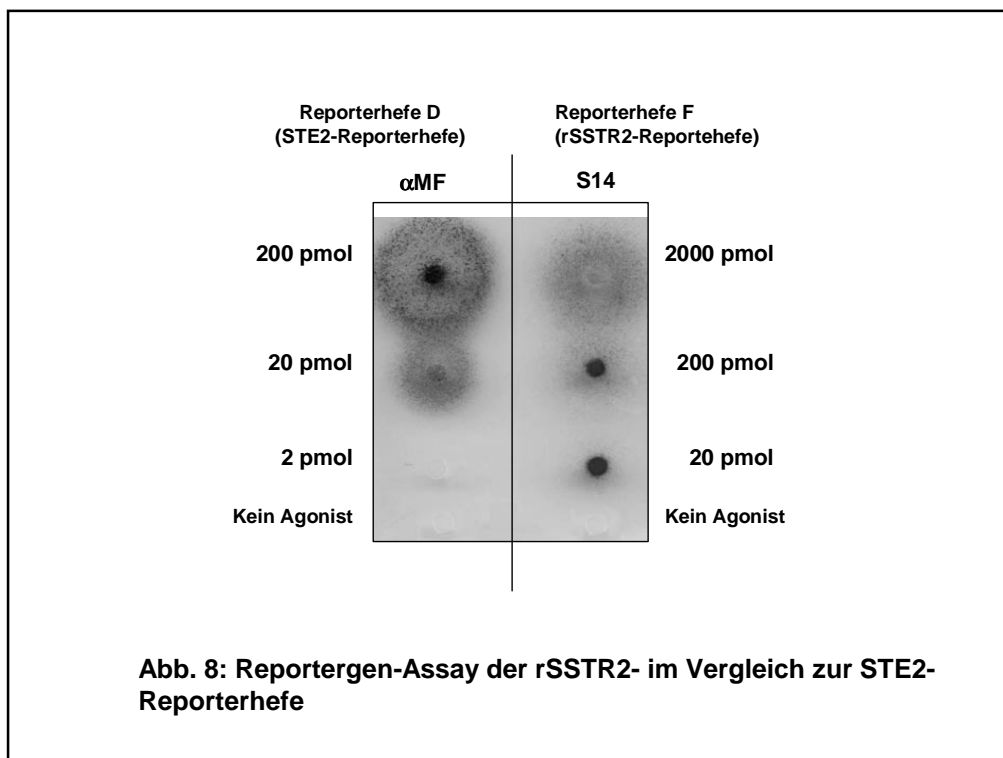
Die Expression des rSSTR2-Gens unter Kontrolle eines MET25-Promotors (MET25p) erwies sich dabei als die effektivste Promotor-Variante zur Expression von rSSTR2 in der Reporterhefe. MET25p induziert die Synthese der Homocystein-Synthase bei Hefen in Methioninmangel-Medium sehr stark und ist zur heterologen Expression



von Proteinen in Hefe besonders gut geeignet. MET25p wurde daher mittels PCR aus dem Hefegenom amplifiziert und in ein 2 $\mu$ -Hefepiasmid kloniert. Zusätzlich wurde als Terminationssignal der Transkription eine Cytochrom c1-Terminatorsequenz (CYCt) eingebaut. Zwischen Promotor- und Terminatorsequenz wurde eine multiple Klonierungsstelle (MCS) eingeführt. Damit wurde ein Hefepiasmid hergestellt (pRSxMET25p), das aufgrund seiner 2 $\mu$ -Replikationssequenz in jeder Hefezelle ungefähr 50-100mal vorkommt (High copy plasmid). pRSxMET25p hat als selektierbares Markergen TRP1, dessen Genprodukt, eine Anthranilat-Isomerase, bereits ein auxotrophes Markergen in allen Reporterhefen ist (Abb. 14A).

Die Induktion des Met25p in pRSxMET25p wurde mit Hilfe eines Testplasmids untersucht. Dazu wurde das LacZ-Gen in pRSxMET25p ligiert (pRSxMET25p-LacZ) und in YPH499 transformiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität quantifiziert. Die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase war wie erwartet abhängig von der Methionin-Konzentration im Medium. Ohne Methionin im Medium war MET25p voll induziert (550 MU). Mit steigender Methionin-Konzentration wurde die Induktion zunehmend schwächer und ging ab 500 $\mu$ M Methionin auf 100 MU zurück (Abb. 14B).

Zur Expression von rSSTR2 unter Kontrolle von MET25p wurde die Reporterhefe E (Abb. 14) mit dem Plasmid pRSxMET25p-rSSTR2 transformiert (Abb.12, Reporterhefe F). Anschließend wurde in einem Agardiffusions-Assay, in methioninfreien Medium, die Aktivierung des PRPs getestet. Wachstum und Blaufärbung der Reporterhefe F waren abhängig von der Zugabe des rSSTR2-Agonisten Somatostatin (S14) und dosisabhängig (Abb. 15, Reporterhefe F).

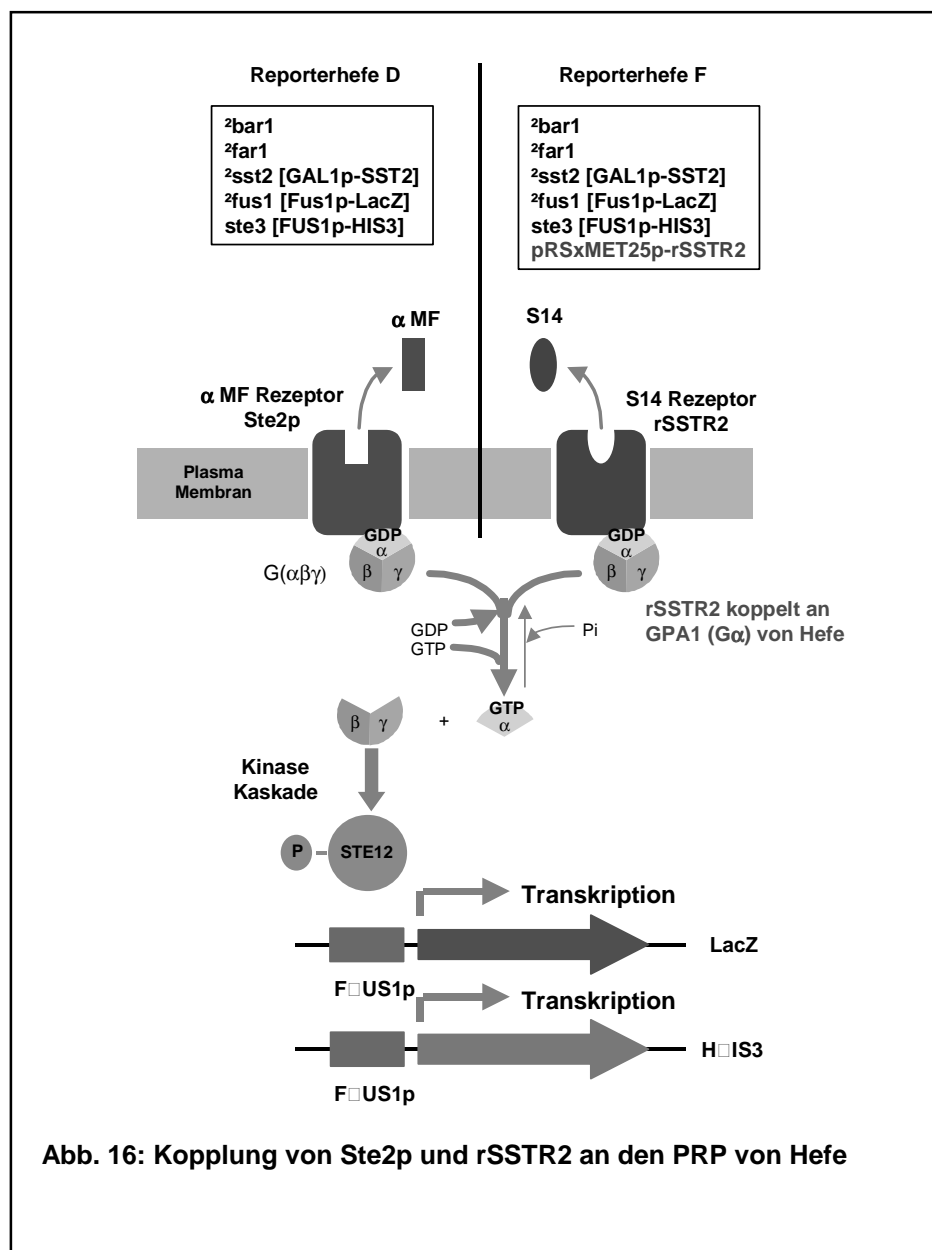


Mit der Herstellung der Reporterhefe F (rSSTR2-Reporterhefe) war es gelungen einen Hefestamm herzustellen, der rSSTR2 exprimiert und funktionell an den PRP koppelt. Die Effizienz der Kopplung an den PRP ist, im Vergleich zu der in Reporterhefe D (STE2-Reporterhefe), um einen Faktor 10 schwächer, was vermutlich an der schwächeren Interaktion des Hefe-G $\alpha$ -Proteins mit rSSTR2 liegt. Die zur Induktion der Reporterogene erforderliche Mindestmenge von 20 pmol S14 wurde aber ohne

weiteres erreicht. Da die Menge einer biologisch aktiven Verbindung, die bei Jerini Biotoools GmbH direkt auf Cellulosemembranen mittels SPOT-Technik synthetisiert wird, ein Mehrfaches dieser Mindestmenge beträgt, ist die rSSTR2-Reporterhefe hervorragend für ein Screening nach neuen rSSTR2-Agonisten geeignet. Die durchschnittlich erhaltene Menge pro SPOT ( $0.23 \text{ cm}^2$ ) liegt im Bereich von 10-100 nmol. Damit ist sichergestellt, daß, selbst bei Verbindungen, die eine drei bis vier Größenordnungen geringere Aktivität als S14 besitzen, ausreichend Substanz bereit gestellt wird.

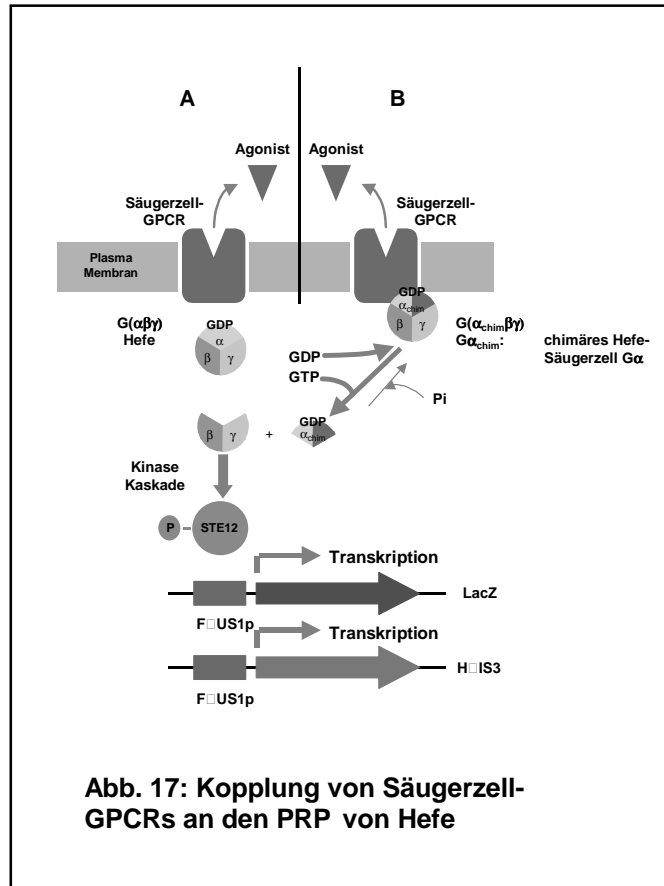
### I.II.II.VII. Chimäre G-Proteine und die funktionale Kopplung weiterer GPCRs an den PRP einer Reporterhefe

Die essentielle Komponente der GPCR-Kopplung an den PRP einer Reporterhefe ist die  $G\alpha$ -Untereinheit des  $G\alpha\beta\gamma$ . Der aminoternale Teil des  $G\alpha$  interagiert mit der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit, während der carboxyterminale Teil mit intrazellulären Teilen des GPCRs in Wechselwirkung tritt. Die Bindung eines Liganden an den GPCR führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die an  $G\alpha\beta\gamma$  weitergegeben wird und die Freisetzung des aktivierten  $G\alpha$  von  $G\beta\gamma$  bewirkt. Bei der heterologen Expression von Säugerzell-GPCRs wie rSSTR2 in Hefe ist diese Kopplung bereits mit der endogenen  $G\alpha$ -Untereinheit von Hefe möglich (Abb. 9). Im Vergleich zur Kopplung



des endogenen Ste2p an den PRP ist diese Kopplung zwar schwächer, kann aber durch gezieltes Ausschalten mehrerer Gene des PRPs verstärkt und, durch die Expression von Reportergenen, sichtbar gemacht werden.

Dagegen führt die Konformationsänderung bei Bindung eines Liganden bei den meisten Säugerzell-GPCRs, die in Hefe exprimiert werden, nicht zu einer Kopplung dieser Konformationsänderung an das Hefe-Gα-Protein (Abb. 17). Daher ist geplant, in der Reporterhefe E (Abb. 12) das Hefe-Gα-Protein durch chimäre Gα-Proteine bestehend aus der aminoterminalen Domäne des Hefe-Gα's und der

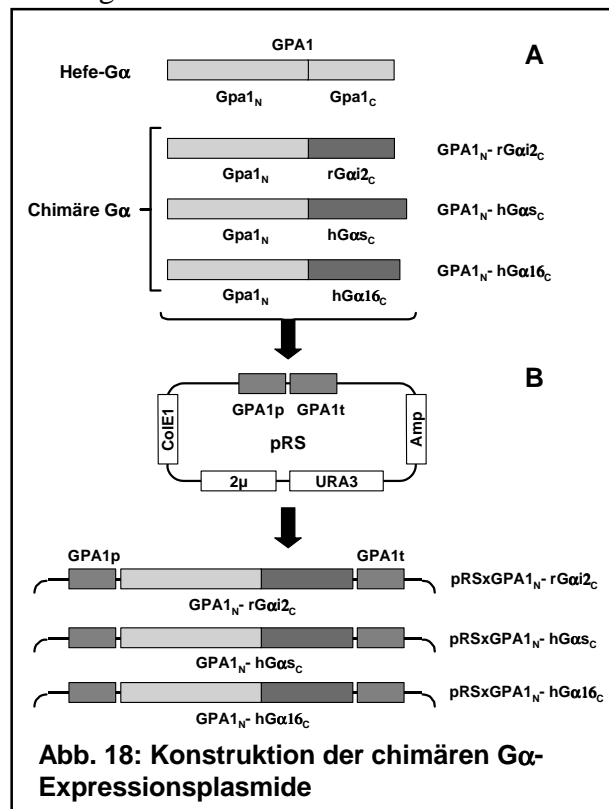


**Abb. 17: Kopplung von Säugerzell-GPCRs an den PRP von Hefe**

carboxyterminalen Domäne von Säugerzell-Gα-Proteinen, zu ersetzen.

Bis heute sind mehr als 15 unterschiedliche Isoformen von G-Proteinen mit unterschiedlicher Rezeptorspezifität in Säugerzellen isoliert und charakterisiert worden. Sie werden, abhängig von ihrer Funktion, in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Von diesen Untergruppen wurden drei, für den Carboxyterminus codierende Sequenzen, mittels PCR aus Säugerzell-cDNA-Banken isoliert (rGαi2<sub>C</sub>, hGαs<sub>C</sub>, und hGα16<sub>C</sub>) und gegen den Carboxyterminus des Hefe-Gα ausgetauscht. Das Ergebnis waren drei verschiedene chimäre Gα's (GPA1<sub>N</sub>-rGαi2<sub>C</sub>, GPA1<sub>N</sub>-hGαs<sub>C</sub>, und GPA1<sub>N</sub>-hGα16<sub>C</sub>) [Abb. 18A], deren funktionale Interaktion mit dem PRP zunächst getestet wurde.

Für die plasmidcodierte Überexpression wurden die Chimären hinter den GPA1-Promotor kloniert (Abb.18 B) und in eine Reporterhefe (Δbar1 Δsst2 [GAL1p-SST2] Δste3) transformiert. In dieser Hefe ist FAR1 nicht deletiert, die Aktivierung

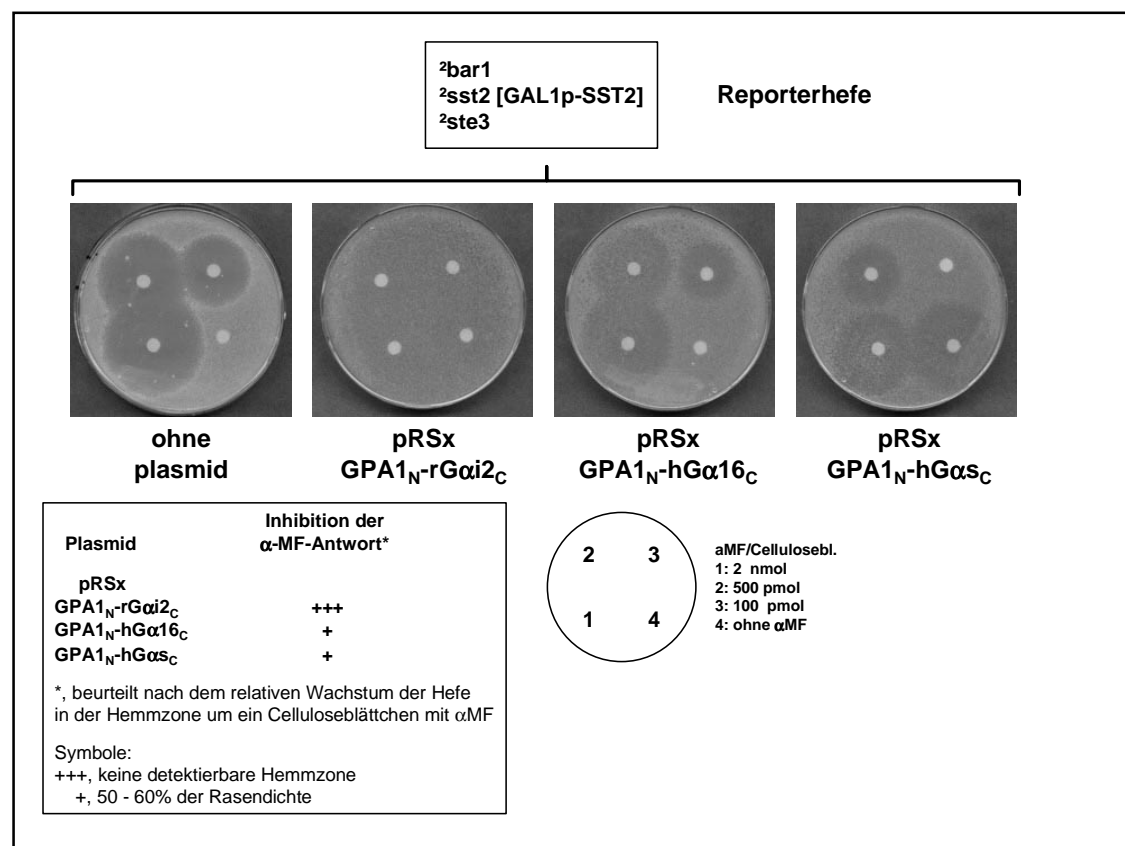


**Abb. 18: Konstruktion der chimären Gα-Expressionsplasmide**



des PRP führt daher zum Zellzyklus-Arrest. Da es sich, bei dem zur Expression der chimären  $G\alpha$ -Proteine verwendete Plasmid, um ein High copy-Plasmid handelte, war etwa 50-100 mal mehr chimäres  $G\alpha$ -Protein als endogenes  $Gpa1p$  in dieser Hefe vorhanden. Die Konsequenz dieses Gendosiseffekts ist eine starke Desensitivierung des PRPs. Bei Aktivierung des PRPs durch  $\alpha MF$  wird noch immer  $G\beta\gamma$  aus  $G\alpha\beta\gamma$  freigesetzt, aber sofort wieder von überexprimierten chimären  $G\alpha$  gebunden und der Signalweg gestoppt. Das kann durch das Auflegen eines Celluloseblättchens mit  $\alpha MF$  auf einen Heferasen sichtbar gemacht werden.  $G\alpha$ -überexprimierende Hefen können auch in einer Zone mit hoher  $\alpha MF$ -Konzentration wachsen.

Abb.19 zeigt die unterschiedliche funktionale Interaktion der überexprimierten chimären  $G\alpha$ 's mit der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit und das daraus resultierende Wachstum der Hefen in der Umgebung von  $\alpha MF$ .  $GPA1_N$ - $rG\alpha i2_C$  maskiert die  $\alpha MF$ -Antwort der STE2-Reporterhefe nahezu vollständig, während die beiden anderen Chimären den PRP etwas schwächer inhibieren. Dagegen ist die  $\alpha MF$ -Antwort der Hefe ohne



**Abb. 19: Maskierung der  $\alpha MF$ -Antwort durch überexprimierte chimäre G-Proteine**

überexprimiertes  $G\alpha$  wie erwartet sehr stark und ihr Wachstum in der Nähe der Celluloseblättchen mit  $\alpha MF$  nicht möglich.

Im nächsten Schritt wurde, ausgehend von Reporterhefe E (Abb. 12), das genomische  $GPA1$  durch die codierenden Regionen der chimären G-Proteine ersetzt und in diesen Hefen die Kopplung weiterer Säugerzell-GPCRs ( $\beta 2$ -Adrenergic Receptor,  $\beta 2AR$ ; Luteinising Hormon Receptor, hLHR und Corticotropin Releasing Factor Receptor, rCRFR) untersucht. Keine dieser Rezeptoren zeigte eine funktionale Kopplung an den PRP, sondern konstitutive Aktivierung der Reportergene. Die Gründe dafür werden zur Zeit untersucht.

### **I.II.II.VIII. Zusammenfassung**

Die prinzipielle Verwendung einer genetisch veränderten Reporterhefe für ein Screening neuer Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) aus Säugerzellen, konnte anhand eines Modellrezeptors erfolgreich gezeigt werden. Dieser Hefestamm wird von der Jerini Biotools GmbH für das Screening nach neuen, nichtpeptischen Agonisten des Somatostatin-Rezeptors (rSSTR2) verwendet.

Der Einbau weiterer Säugerzell-GPCRs in eine Reporter-Hefe wird zur Zeit getestet und ist von weiteren Modifikationen im Genom der Reporterhefe abhängig. Die Herstellung einer Reporterhefe, die eine universelle Kopplung von heterolog exprimierten GPCRs an die Pheromon-Transduktionskaskade erlaubt, ist wahrscheinlich nicht möglich. Es werden daher verschiedene G-Proteinchimärenkonstrukte notwendig sein, die für den jeweiligen Target-Rezeptor auf eine effektive Kopplung getestet werden müssen.

Um die Identifikation und Klonierung des Thaumatin-Rezeptors durch einen Expressionsscreen in Hefe durchzuführen, muß zunächst ein Reporter-Hefestamm hergestellt werden, in dem die funktionelle Expression eines heterologen Rezeptors gewährleistet ist.

Zu diesem Zweck wurde der Ratten-Somatostatin-Rezeptor (rSSTR2) ausgewählt und unter Kontrolle verschiedener Promotoren in der zu testenden Reporter-Hefe ( $\Delta$ bar1,  $\Delta$ far1,  $\Delta$ ste2, pFUS1-LacZ) exprimiert. Wie sich zeigte, war die Kopplung des rSSTR2 an die Pheromon-Transduktionskaskade, die als Kennzeichen einer funktionellen Expression herangezogen wurde, so nicht möglich.

Zu weiteren Versuchen wurde ein Vorläufer ( $\Delta$ bar1,  $\Delta$ far1, pFUS1-LacZ) der oben beschriebenen Reporter-Hefe herangezogen. Es ist bekannt, daß eine Disruption des SST2-Gens in Wildtyp-Hefen eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber dem  $\alpha$ -Matingfaktor zur Folge hat. Daher wurde im Vorläuferstamm eine SST2-Disruption eingeführt und deren Effekt auf die Reporter-Gen-Aktivität nach Aktivierung der Pheromon-Transduktionskaskade mit  $\alpha$ -Matingfaktor untersucht.

Alle so getesteten  $\Delta$ sst2-Hefestämme zeigten die erwartete höhere Sensitivität. Allerdings wurde nach mehrmaligem Kultivieren eine konstitutive Reporter-Gen-Aktivität bzw. eine völlige Insensitivität gegenüber dem  $\alpha$ -Matingfaktor festgestellt. Außerdem waren alle  $\Delta$ sst2-Stämme im Vergleich zu Wildtyp-Hefen im Wachstum verlangsamt und morphologisch anomal. Bei mikroskopischen Inspektionen wurden bei ungefähr 20 % der Zellen auch ohne  $\alpha$ -Matingfaktor-Zugabe eine birnenförmige, verlängerte Morphologie festgestellt.

$\Delta$ sst2-Hefen sind nur dann geeignete Reporter-Hefen, wenn ein Weg gefunden werden kann, der zu einem stabilen Phänotyp führt. Das sollte durch eine stringente Regulation der Expression von SST2 mittels einer plasmidkodierten Kopie möglich sein.

### **I.II.III. LION Biosciences, University Stuttgart-Hohenheim and Unilever: Identification of taste receptor genes**

The goal of this subproject is the identification of novel taste bud specific genes. The experimental strategy to isolate these genes is based on the molecular comparison of two cDNA populations from mRNAs derived from tissue samples containing taste buds and tissue samples lacking taste buds. Taste-specific cDNA-Fragments are enriched by subtractive PCR, and subsequently individually spotted on cellulose filter membranes. After several cycles of eliminating redundant cDNAs 4.087 of the remaining cDNAs were sequenced and subjected to a first bioinformatical analysis at LION.

A first dataset of 384 cDNA sequences was used for the development of the tools and routines for subsequent detailed analysis of the clones:

#### **I.II.III.I. Generation of cDNA-libraries and enrichment of taste-specific cDNA-fragments by subtractive PCR followed by spotting of differential cDNAs on filter array**

Poly(A)<sup>+</sup> RNA was isolated from different taste bud preparations derived from circumvallate papillae, foliate papillae and fungiform papillae and their respective surrounding tissue. From all taste bud samples and corresponding tissues cDNA representations were generated and controlled extensively by PCR and southern blot hybridisation. The presence of taste bud specific genes was monitored in the taste bud cDNA representations as well as their absence in cDNA representations of non taste bud containing tissue (*see LION-report no. 1*).

Subtractive hybridisation was performed with samples derived from foliate and fungiform papillae (tester material) and the two corresponding so-called driver samples derived from surrounding non taste bud tissue. After determination of the appropriate cycle number for PCR amplification, the subtracted cDNA material was further checked by monitoring the enrichment of tester specific genes. The subtraction of cDNA fragments that were only expressed either in the driver material or equally expressed in both tester and driver was controlled in parallel. One amplified cDNA subtraction of each foliate and fungiform papillae - called S#2 and S#4 respectively - fulfilled the defined quality criteria best. They were cloned into a vector and transformed into E. coli cells (*see LION-report no. 2*).

Additionally, another subtraction was performed using taste buds from fungiform papillae with modified hybridisation conditions. The goal of this subtractive hybridisation was a further enrichment of taste bud specific genes, since some of the positive controls were less enriched in subtraction S#4 compared to subtraction S#2. After monitoring of either enrichment or subtraction of control genes and comparison with subtraction S#4, another fungiform subtraction, called S#6, was cloned into an appropriate vector and transformed into E. coli cells (*see LION-report no. 3*).

All subtractive libraries were checked further with respect to insert content. Library S#2 was monitored for the presence of gustducin and actin cDNA fragments by hybridisation. In the next step, a large number of colonies of each library was plated and a total number of 27,264 clones was picked into 384 well plates. The colonies were subsequently spotted onto nylon membranes (21 x 21 cm) that were placed onto

agar plates. The filters were now inoculated with 13440 colonies derived from library S #2 and 6912 colonies from each libraries S #4 and S #6. To fulfil the defined milestone criteria we hybridised the membranes containing the three spotted library clones with specific cDNA probes for taste bud specific genes. Since the milestone could be regarded as fulfilled, we continued with the project (*see LION-report no. 4*).

#### **I.II.III.II. Elimination of redundant genes on filter array by repetitive hybridisation**

The aim of this experimental approach was the reduction of the clone number that had subsequently to be sequenced. In general, even after the normalisation step of the subtractive hybridisation many of the clones are more abundant than others. These clones had to be eliminated before further analysis.

Since the distribution of these clones over the filters was not known, a certain number of clones was randomly picked, labelled and used as hybridisation probes. Statistically seen, this collection of clones contains high abundant genes that identify all other identical genes by simple hybridisation. All clones, that hybridised with the probes were excluded from further analysis. The probes itself were sequenced to avoid loss of sequence information and the clones that hybridised with the labelled probe were identified. To enlarge the number of identified clones, not only single hybridisation probes were used but pools of probes containing in between 12 and 48 probes.

A total number of 27,264 colonies was picked from libraries S#2, #4 and #6 and spotted onto 30 identical nylon membranes. 2070 of these clones did not grow neither in the 384 well plate nor on the filters. Therefore, a total number of 25,445 clones of the three subtractive libraries was present on the filters.

Another 271 clones were spotted additionally onto the same filters. These clones contained inserts that were known from the first subtractive cDNA cloning where epithelial sheets from circumvallate papillae were used as the tester material. Among this set of clones there was some redundancy, e.g., SPRP was represented by several identical cDNA fragments per family member. Additional clones coding for TR1 and TR2 were included.

This set of formerly sequenced cDNA fragments was used for the first round of hybridisation. Clones that gave positive signals after hybridisation with these labelled cDNA fragments were identified and were not included in selections of further probe pools. 3,959 clones did hybridise with the cDNA probes present in the hybridisation pools and gave a signal. In other words a total number of 21,486 clones remained without a hybridisation signal after this first round of hybridisation.

From these residual clones, the next set of hybridisation probes was selected by taking 50 % of the cDNA probes from library S#2 and 25 % each from libraries S#4 and #6. This set of probes was split into several pools of hybridisation probes that contained between 8 and 12 labelled cDNA fragments. The filters were hybridised in parallel, and subsequent analysis of the hybridisation signals revealed that after this 2<sup>nd</sup> round of redundancy elimination 19,787 clones remained without a hybridisation signal. From these clones, we again have selected clones for labelling and hybridisation. Altogether we have performed 4 rounds of hybridisation.

Table 1 shows the statistical analyses of the rounds of hybridisation. During the hybridisation process the number of clones that had to be analysed by sequencing was reduced from 25,211 clones to 16,686 clones. This means that 8,525 clones had not to be

sequenced since they were redundant within the libraries and were identified by sequencing of the probe pools.

During the 4<sup>th</sup> round of hybridisation no further significant elimination of redundancy could be observed, which could lead to further decrease of the number of remaining clones. Therefore, we decided to start with the sequence analysis.

library	# of clones at start	# of clones eliminated during hybridisation				remaining clone #s
		1 <sup>st</sup> round	2 <sup>nd</sup> round	3 <sup>rd</sup> round	4 <sup>th</sup> round	
S #2	12,145	1,974	307	1,862	273	7,729
S #4	6,466	1,130	261	801	40	4,234
S #6	6,600	855	206	725	91	4,723
altogether	<b>25,211</b>	3,959	774	3,388	404	<b>16,686</b>

**Table 1: Statistical analysis of the hybridisation rounds**

This table shows the efficiency of the redundancy elimination. Column "# (number) of clones at the beginning" indicates the number of clones that were grown on the filters in each library (see the first column) and in all libraries together. In the next 4 columns (indicated by 1<sup>st</sup> round to 4<sup>th</sup> round) the number of clones that could be eliminated through hybridisation are indicated. The last column summarises the hit clones of all rounds.

### I.II.III.III. Sequencing and primary sequence analysis of remaining clones

According to the research agreement, 4000 clones, including those clones that were used for the hybridisation pools, should be sequenced. Since it is known that for any reason a certain number of clones would not grow, some would contain multiple inserts or plasmids and some clones would contain only poly(A)<sup>+</sup> stretches, LION has sequenced more than 4000 clones to enlarge the number of resulting meaningful sequences. The processing of the sequences was done in several steps as explained here:

Step 1: The raw sequences derived from the sequencer were collected and checked for ambiguities.

Step 2: The adapters derived from the subtraction procedure were clipped automatically.

Step 3: Poly T stretches were automatically removed from the sequences.

Step 4: Sequences smaller than 50 bp were removed from the sequence list.

Step 5: The remaining sequences were checked by hand, if all the adapters, poly Ts and small sequences were successfully removed.

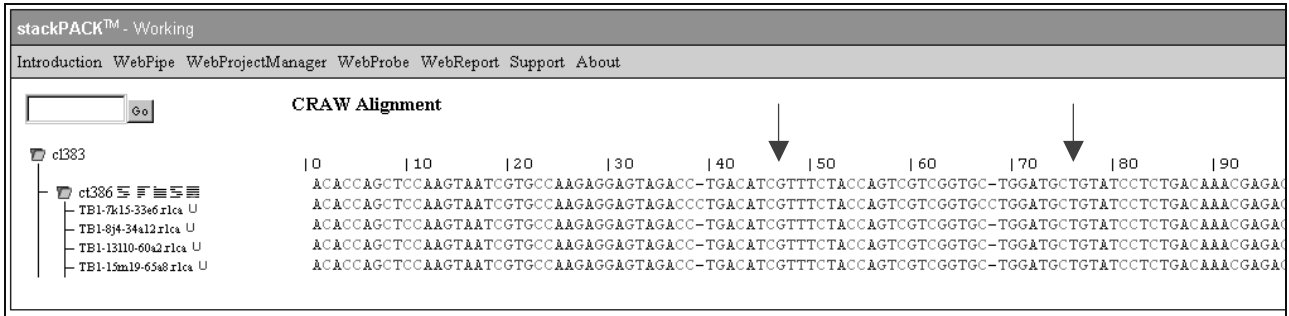
Finally, 4087 sequences remained in the sequence collection after applying processing steps 1 - 5.

### Clustering of processed sequences

Since single read sequences may contain base errors, all sequences were clustered to obtain consensus sequences of highest quality possible.

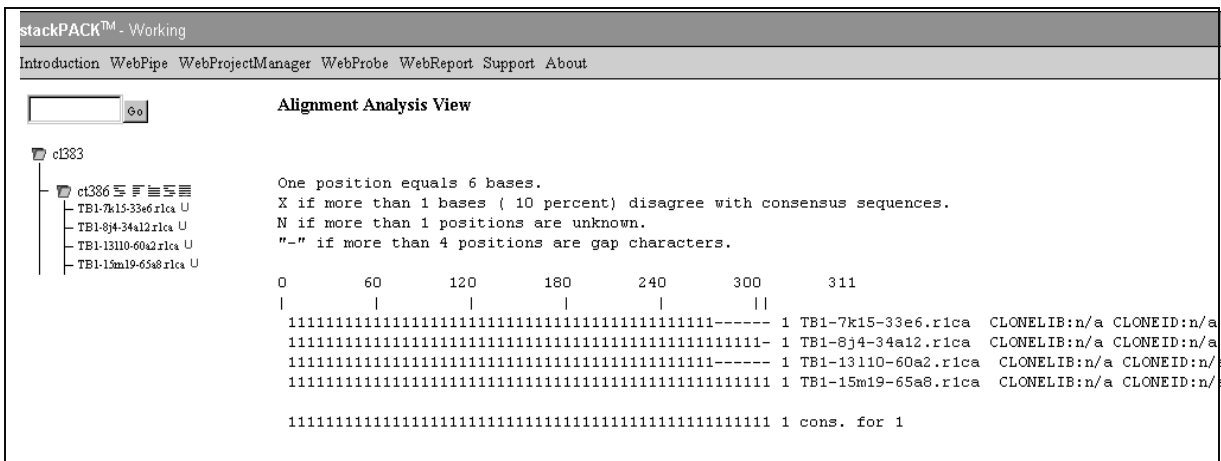
Clustering was done using stackPACK<sup>TM</sup>. All 4087 sequences were analysed in parallel. An example of the clustering is given in figure 1. Cluster cl383 was selected that contains 4 sequences. All sequences start with the half of the RsaI site "AC", the adapters that were derived from the subtractive hybridisation procedure were removed. The sequences of the four clones are identical except an additional C at positions 39 and 68 in clone TB1-7k15-33e6.r1ca (see arrows in figure 1). The

consensus sequence ct386 does not contain these additional nucleotides since the other three clones lack these Cs.



**Fig. 1: Identification of consensus sequences from different independent sequenced cDNA inserts.** The contig construction through multiple sequence alignments (clustering) allows the correction of single base ambiguities or insertions/deletions and the creation of a consensus sequence that can be used for BLAST alignments. Arrows indicate the positions in the consensus sequence where base errors in the clustered sequences were eliminated.

In figure 2 another view of the clustering process is shown. This is an example of a so called "primary consensus" cluster. The clustered sequences were identical so one defined consensus sequence was found. In cases where more than one consensus sequence was found, secondary consensus sequences were defined. This is due to splice variants that occur in different transcripts of the same gene.



**Fig. 2: Analysis view of the cluster alignment** This view is used to control the number of found consensus sequences. In the case of cluster 383 only one single consensus sequence, indicated by 1, was found comparing the sequences of the four clones in the cluster.

Analysis of these 4087 sequences yielded a total number of 779 clusters. 1159 cluster contain only one single sequence. 362 cluster contain two sequences, 163 cluster contain 3 sequences and so forth (see table 2). Secondary clusters are included.

seq. per cluster	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	16	17	18	20	23	24	43
# of clusters	1159	362	163	96	54	23	19	11	12	9	7	4	2	3	1	3	1	2	4	2	1

**Table 2: Statistical analysis of clustering 1**

Row 1 (seq. per cluster) contains the number of sequences per cluster, row 2 (# of clusters) contains the number of clusters. For further details see text.

Some clusters still contained a high number of sequences, e.g., the cluster with 43 aligned sequences matched gustducin-sequences. During elimination of redundancy some hybridisation signals were extremely weak. In these cases, the respective clones were not selected to be eliminated to avoid loss of unknown, eventually cross-hybridising clones. Therefore, some of the clones were still present in multiple copies.

In table 3 the complete process of sequence analysis is composed:

total sequences	4087
unique sequences	1962
redundancy	2.08
single sequences	1159
sequences in clusters	2928
consensus sequences	803
primary consensus sequences	784
number of clusters	779
secondary consensus sequences	19

**Table 3: statistical analysis of clustering 2**

A total number of 4087 sequences was clustered at first. 1962 unique sequences from either single or consensus sequences were among the 4087 clones. Dividing the total number of sequences by the number of unique sequences results in a redundancy of 2.08. All 4087 sequences were clustered, resulting in 1159 single clusters (containing only 1 sequence) and 2928 clusters with two or more sequences. All in all, 803 clusters could be defined and their consensus sequence determined. These 803 clusters comprise 784 primary and 19 secondary clusters.

The single sequences and the consensus sequences of the clustered sequences were than further analysed by BLAST searches. The number of the analysed sequences was 1962 (the sum of 1159 and 803).

#### **I.II.III.IV. Homology searches by BLAST**

Single sequences or consensus sequences were annotated via BLAST searches (For references see [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_overview.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_overview.html)) against NCBI UniGene databases of *Rattus norvegicus* (RN), *Mus musculus* (MM) and *Homo sapiens* (HS). The main advantage of UniGene clusters is the availability of potential full length sequences even if only a part of a gene was sequenced and used for BLAST search. The minimum length of identical stretches was set to 50 bp, the minimum homology was set to 95 % in rat, and 90 % in mouse and human. The output format of the resulting table is shown in table 3 below.

queryID	query Len	Unigene Id	subject Id	subject Len	subject Desc	score	ident	qstart	qend	sstart	send	unigene Title	unigene Gene
1. <a href="#">XXX</a>	2.	3. <a href="#">XXX</a>	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.

**Table 3: Output format of the BLAST searches**

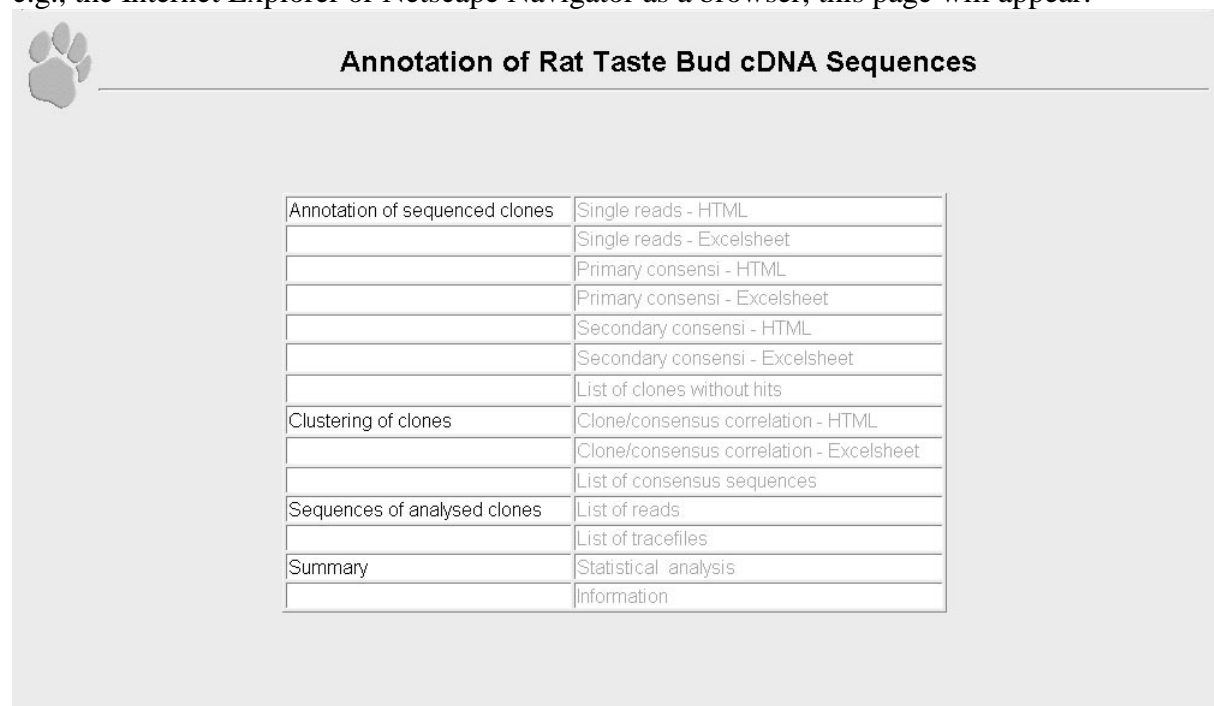
To explain the abbreviations, the single columns were consecutively numbered. 1. queryID: identifier of the query sequence; 2. queryLen: length of the query sequence; 3. unigeneID: identifier of unigen cluster; 4. subjectID: identifier (Accession No.) of subject sequence within unigene cluster; 5. subjectLen: length of subject sequence; 6. subjectDes: description of subject sequence; 7. score: quality of match; 8. ident: percentage of homology; 9. qstart: start of query sequence; 10. qend: end of query sequence; 11. sstart: start of subject sequence; 12. send: end of subject sequence; 13. unigeneTitle: Title; 14. Unigen-Gene: gene identifier of unigene cluster; Links to further tables or pages are written in blue, words are underlined. Links are only working in the html version of the BLAST outputs. Excel sheets were added to make sorting of results possible.

From the 1159 single sequence "clusters" 219 sequences could be annotated regarding the chosen minimum of identity to rat, human and mouse (95 %, 90 % and 90 %, respectively). 940 sequences do not match any annotated gene.

From the 803 multiple sequence clusters 537 consensus sequences (including 2068 sequences) could be annotated. The remaining 266 consensus clusters (comprising 860 sequences) did not match to annotated genes of the chosen databases under the chosen minimum of identity.

#### I.II.III.V. Result of data analysis

All BLAST results, trace files of the sequencers and FASTA files of the sequences were burned onto a CD. The content of the CD can be viewed by using e.g., the Windows Explorer. The start page will open by clicking on the file index.html. Using e.g., the Internet Explorer or Netscape Navigator as a browser, this page will appear:



Annotation of Rat Taste Bud cDNA Sequences	
Annotation of sequenced clones	Single reads - HTML
	Single reads - Excelsheet
	Primary consensi - HTML
	Primary consensi - Excelsheet
	Secondary consensi - HTML
	Secondary consensi - Excelsheet
	List of clones without hits
Clustering of clones	Clone/consensus correlation - HTML
	Clone/consensus correlation - Excelsheet
	List of consensus sequences
Sequences of analysed clones	List of reads
	List of tracefiles
Summary	Statistical analysis
	Information

Further information can be found in report 5 of LION



LION provided Unilever with a copy of the complete library. This library was sent to the University Stuttgart-Hohenheim for further analysis (see below).

This project started in April 2000 to isolate novel taste bud specific genes. LION has obtained the appropriate starting material from Unilever to finally perform a subtractive hybridisation that would lead to an enrichment of taste bud specific genes in a cDNA library. Three cDNA libraries, were cloned and plated in high density onto a filter. After elimination of redundancy by subsequent hybridisation steps and subsequent sequencing of the remaining clones, 4087 sequences were first clustered and then analysed by BLAST searches. 219 clones of the single read clusters could be annotated, whereas the rest of these sequences did not match any known gene under the chosen thresholds. From the clustered sequences, 537 out of 803 consensus sequences matched an annotated gene in the chosen databases.

LION is quite confident that this group contained encouraging candidates for further analysis and that even known genes could turn out to be interesting for Unilever. Further analysis of the sequences that did not match known genes will be necessary. In a first step, the selected threshold could be modified to perform less stringent searches. Sequences of interest could be analysed further by applying the appropriate software at either Unilever or LION (bioSCOUT™). LION offers Unilever to think about strategies to further evaluate the sequences and to help Unilever to get the best results as fast as possible.

### **I.II.III.VI. Development of analysis strategy for the 1.962 cDNA sequences identified as unknown from rat taste bud tissue**

Within the 'Taste Perception' project an external research contract with LION Biosciences has been finalised. The aim of this contract is to isolate novel taste specific genes based on comparison of two mRNA populations derived from tissue samples containing taste buds and tissue samples lacking taste buds from rat. This resulted in a set of 16,686 clones of which 4087 clones were sequenced. Clustering and elimination of double sequences resulted in a set of 1962 unique sequences. These sequences were identified by sequence homology search using BLAST against the NCBI UniGene database of *Rattus norvegicus* (Rn), *Mus musculus* (Mm) and *Homo sapiens* (Hm).

Simultaneously the 'Taste Perception' project reserved resources (0.4 FTE) to analyse the sequence clones internally using the Bioinformatics Facilities at Unilever Research Vlaardingen (described in VD 000074). This short document summarises the results of a pre-analysis of 247 test-clone sequences and recommends on how to proceed.

#### **A Summary of the results of the analysis of first 247 Lion clones.**

##### *A.1. Homology searches at Unilever Research Vlaardingen against nonredundant DNA databases.*

1. 247 clones were analysed by running a BLASTN against all nucleotide databases, recently fully updated (date).
2. One clone was empty (no sequence data), so the analysis was done with 246 clones.
3. The multiple BLASTN resulted in:  
10 clones with no BLASTN output file  
236 clones with BLASTN output file  
The most likely cause of the lack of a BLASTN output file is the time-out on the BLAST procedure. These 10 clones still need to be run a BLASTN.
4. Of the 236 clones with BLASTN output files the multiple BLASTN resulted in:
  - 67 clones with no hit
  - 76 clones with an mRNA hit (of which 15 clones were identified as patented sequence!)
  - 84 clones with an EST hit
  - 8 clones with an HTG hit
  - 1 clone with an GSS hit

All data are summarised in overview\_filtered.xls

##### *A.2. Homology searches at Lion against UniGene databases*

1. The BLASTN of the 246 clones against the UniGene database by LION resulted in:
  - 93 clones with no hit.
  - 153 clones with a UniGene hit
2. This suggests that LION with their criteria was not able to identify 93 clones. In our analysis we were not able to identify 67 clones (no BLASTNhit with E-value <E-30) and 10 clones (no BLASTNfile due to process time-out).

3. Of the 10 clones with no BLASTN output file, 6 clones were identified by LION as having a UNIGENE homolog. This suggest that the total score of identified clones by the BLASTN procedure will be as follows:
- 67 clones currently identified as unknown
  - 169 clones identified by mRNA, EST, HTG or GSS hit
  - 4 clones to be analysed with BLASTN, most likely to be identified as unknown
  - 6 clones to be analysed with BLASTN, most likely to be identified as known sequence.

### *B.3. Comparison of homology searches by Lion and at Unilever Vlaardingen.*

Of the 246 original cloned sequences, Lion identified 153 clones (62%), whereas at Vlaardingen 175 (169 + 6) clones were identified (71%) We noted that 6 clones still had to be Blasted against DNA databases, but that these clones have a 100% chance of identification, because these were also identified by Lion.

The reason of the higher score at Vlaardingen is due to the lower homology cut-off value and the search against all nonredundant DNA sequence databases instead of only, mouse, rat and human sequences.

### *C. Recommendation*

At LION Biosciences 4087 clones were sequenced. These clones were analysed (see LION report) and reduced to:

1159 single sequence clones

803 clusters (784 primary consensus sequence, 19 secondary consensus sequences).

This results in a total of 1159 + 803 = 1962 sequences to be analysed.

Based on the previous experience it was recommended to proceed as follows:

#### *C.1. From cloned DNA sequence to known mRNA, EST, HTG, GSS or unknown DNA sequence*

1. Obtain a list with 1159 single sequence clones and 803 cluster sequence clones in FASTA format (at present we only have the 4087 original sequence files and the 803 cluster sequence files)
2. Run a multiple BLASTN against nucleotide databases (EMBL, EMBL\_NEW, EMBL\_EST, EMBLNEW\_EST) with default settings. This should result in 1962 BLASTN files.
3. Analyse the 1962 BLASTN files by a multiple Parse\_blast perlscript. Using this script it is possible to extract the following information from the BLASTN files:
  - a. Is there a hit with an E-value < E-30
  - b. Extract all hits with E-value < E-30

This information is stored into a 'significant\_hits' file to be used for further analysis

4. This 'significant\_hit' file is analysed further using a perl\_script 'add\_sign\_hits.pl' (Ewoud Schuring) extracting the following information:
  - a. name of the sequence file

- b. direction of sequence (based on the SMART sequence)
  - c. type of fragment, 5' or 3' (based on the SMART sequence)
  - d. name of the BLASTN file
  - e. E-value of most significant hit from the BLASTN file
  - f. type of database of the most significant hit (to identify whether the hit is an mRNA, EST, HTG or GSS)
  - g. the EMBL entry number of the most significant hit
  - h. the description of the EMBL entry
  - i. the first nucleotide number of the clone sequence over which an alignment with an EMBL entry was found (query\_begin)
  - j. the last nucleotide number of the clone sequence over which an alignment with an EMBL entry was found (query\_end)
  - k. the first nucleotide number of the EMBL sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_begin)
  - l. the last nucleotide number of the EMBL sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_end)
  - m. the nucleotide sequence of the clone sequence (to facilitate primer selection).
5. The above information is stored in an Excel sheet, resulting in 1962 lines with information on the most significant EMBL hit found by the BLASTN. Using the filter option in Excel the 1962 clones can be subdivided into:
    - a. clones having an mRNA homologue
    - b. clones having an EST homologue
    - c. clones having an HTG homologue
    - d. clones having an GSS homologue
    - e. clones having no homologue
  6. clones having an mRNA homologue have to be manually evaluated by Lars and Erwin.
  7. clones having an EST, HTG, GSS or no homologue must be analysed further.

*C.2. From cloned DNA sequence to known or unknown protein sequence.*

1. Run a BLASTP of all clones against the non-redundant protein sequence databases.
2. Analyse the BLASTP files similarly as above (significance level at E-value < E-30 (lookup?)), extracting for all clone sequences the following information fields:
  - a. name of the BLASTP file
  - b. E-value of most significant hit from the BLASTP file
  - c. type of database of the most significant hit (to identify whether the hit is an SwissProt, Pir, TREMBLE, SwissNEW, TREMBL\_NEW)
  - d. the SwissProt/TREMBLE entry number of the most significant hit
  - e. the description of the SwissProt/TREMBLE entry
  - f. the number of one of the six translation frames that was used to identify the significant hit
  - g. the first nucleotide number (or translated amino acid no.) of the clone sequence over which an alignment with an SwissProt/TREMBLE entry was found (query\_begin)

- h. the last nucleotide number (or translated amino acid no.) of the clone sequence over which an alignment with an SwissProt/TREMBLE entry was found (query\_end)
- i. the first amino acid number of the SwissProt/TREMBLE sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_begin)
- j. the last amino acid number of the SwissProt/TREMBLE sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_end)

*C.3. From cloned DNA sequence to known or unknown protein structure.*

1. Run a BLASTP of all clones against the Brookhaven Protein Structure Database, to determine whether the clone sequence have a protein homologue with known structure
2. Analyse the BLASTP files using Parse\_blast script, collecting significant hits with E-values < 0.01 (?) and extracting the following information fields.
  - a. name of the BLASTP file
  - b. E-value of most significant hit from the BLASTP file
  - c. the PDB entry number of the most significant hit
  - d. the description of the PDB entry
  - e. the number of one of the six translation frames that was used to identify the significant hit
  - f. the first nucleotide number (or translated amino acid no.) of the clone sequence over which an alignment with a PDB entry was found (query\_begin)
  - g. the last nucleotide number (or translated amino acid no.) of the clone sequence over which an alignment with a PDB entry was found (query\_end)
  - h. the first amino acid number of the PDB sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_begin)
  - i. the last amino acid number of the PDB sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_end).

*C.4. From cloned DNA sequence to known or unknown Human Genome sequence.*

1. Run a BLASTN of all clones against the Human Genome Database (HGD) to determine whether there is a Human sequence homologue and the gene location.
2. Analyse the BLASTN files using Parse\_blast script, collecting significant hits with E-value < 0.01 and extracting the following information fields:
  - a. name of the BLASTN file
  - b. E-value of most significant hit from the BLASTN file
  - c. the Human Genome Database entry number of the most significant hit
  - d. the description of the Human Genome Database entry
  - e. the first nucleotide number of the clone sequence over which an alignment with a HGD entry was found (query\_begin)
  - f. the last nucleotide number of the clone sequence over which an alignment with a HGD entry was found (query\_end)
  - g. the first amino acid number of the HGD sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_begin)

- h. the last amino acid number of the HGD sequence over which an alignment with the clone sequence was found (subject\_end)

#### D. Result

The result of the analysis was converted into an Excel sheet with one line per clone, subdivided in 4 parts:

		DNA homology		Protein homology	Structure homology	Genome homology
filename	UniGene	Blastn nr_nucleotide		Blastp nr_protein	Blastp PDB	Blastn HGD
			database_type			
*.fas	Mm, Rn, Hs	...	EM_mRNA			
..		...	EM_EST			
..		...	EM_HTG			
..		...	EM_GSS			
..		...	blank			

Next steps are:

1. Add the UniGene hits found by LION Biosciences. It can be that LION identified three type of UniGene hits, in mouse, rat and human. It is therefore suggested to include the hits in one column, by comma-separated UniGene entry numbers.
2. Filter the Excel sheet on type of DNA homology (unknown, mRNA, EST, HTG, GSS); this will result in different groups of hits identified by highest DNA homology and will include a potential protein homologue, a potential structural homologue and a potential genome homologue.
3. Each group can then be analysed manually to identify potential interesting clones.

#### E. Actions to be done

1. Store all clone sequences in flat file format to be inserted into SRS
2. Download the Humane Genome Database
3. Run 4 types of Blasts against default settings:
  - a. BLASTN against non-redundant nucleotide databases
  - b. BLASTP against non-redundant protein databases
  - c. BLASTP against PDB
  - d. BLASTN against Human Genome Database
4. Save all Blastfiles
5. Analyse all Blastfiles using Parse\_blast perl script with different E-value cut-off (see above)
6. Adapt current perl\_script (Ewoud) to analyse the Parse\_blast results to include all the information fields in an tab-delimited file to be imported into Excel
7. Transform the Excel format into HTML format to include the link to the following files:
  - a. Original sequence files of all clones: \*.fas
  - b. Original blast files (these will be 4 types: (see above))
  - c. UniGene entry file (either local or at NCBI)
  - d. EMBL entry of best DNA homology hit

- e. SwissProt/TREMBLE entry of best protein homology hit
- f. PDB entry of best structural homology hit
- g. Human Genome Database Entry of best Genome homology hit.

### I.II.III.VII. Status report of bioinformatical analysis of 4096 cDNAs from taste bud tissue and sequenced by LION (Status Feb. 2001)

The data analysis for the complete list of 1962 unique sequences out of the 4096 cDNAs was performed by the University Stuttgart-Hohenheim and the Bioinformatics Department at Unilever as described in II.I.II.III.VII.

#### Characteristics of distinct cDNA library subsets

TB1 (foliate taste papilla library)	Comparably large number of novel genes with known homologues (48%); large number of genes known to be involved in taste transduction
TB2 (fungiform taste papilla library 1)	
TB3 (fungiform taste papilla library 2)	Large number of novel genes without known homologues (53%)
Clusters (more than one copy of the specific clone in the 3 libraries)	Large number of known genes (41%) and ESTs (35%); comparably few novel genes without known homologues (15,8%)

#### Features of cDNA clones identified by first round of bioinformatics analysis

##### ESTs known to be involved in taste transduction

gustducin	McLaughlin et al., 1992
transducin	McLaughlin et al., 1992
metabotropic glutamate receptor subtype 4	Chaudari et al., 2000
G protein beta subunit subtype 1	Huang et al., 2000
7TM taste cell-specific receptor T1R1	Hoon et al., 1999
7TM taste cell-specific receptor T1R2	Hoon et al., 1999
Orthologues of the bitter receptor family members T2R10 (human) and TRB3 (mouse)	Adler et al., 2000
6 novel members of the T2R receptor family	
FAT fatty acid translocase	Fukuwatari et al., 1997

##### ESTs possibly involved in taste transduction

6 splicing variants of novel RGS (regulator of G-Protein signaling) protein subtype	Specifically expressed in subpopulation of taste bud cells (in situ hybridization)
Polycystin-like protein (Ca-activated cation channel)	Not tested yet
Orphan G protein coupled receptors	No in situ hybridization signals
unclassified G protein gamma subunit	Differential in PCR; no in situ hybridization signals
4 Clones with very weak similarity to G protein coupled receptors or ion channels	Not tested yet
Known and novel Ca-activated chlorid channels	1 novel tested: non-differential in PCR; no in situ hybridization signals
Lysophosphatidic acid receptor	Not tested yet



ESTs possibly involved in taste cell growth control and differentiation

EphA7 tyrosine kinase receptor	Specifically expressed in taste papillae
c-kit tyrosine kinase receptor	Specifically expressed in subpopulation of taste bud cells
Drosophila roundabout-homologue Robo1 transmembrane receptor	Not tested
Several kinases	
Several transcription factors	1 tested: specifically expressed in subpopulation of taste bud cells

### Conclusion

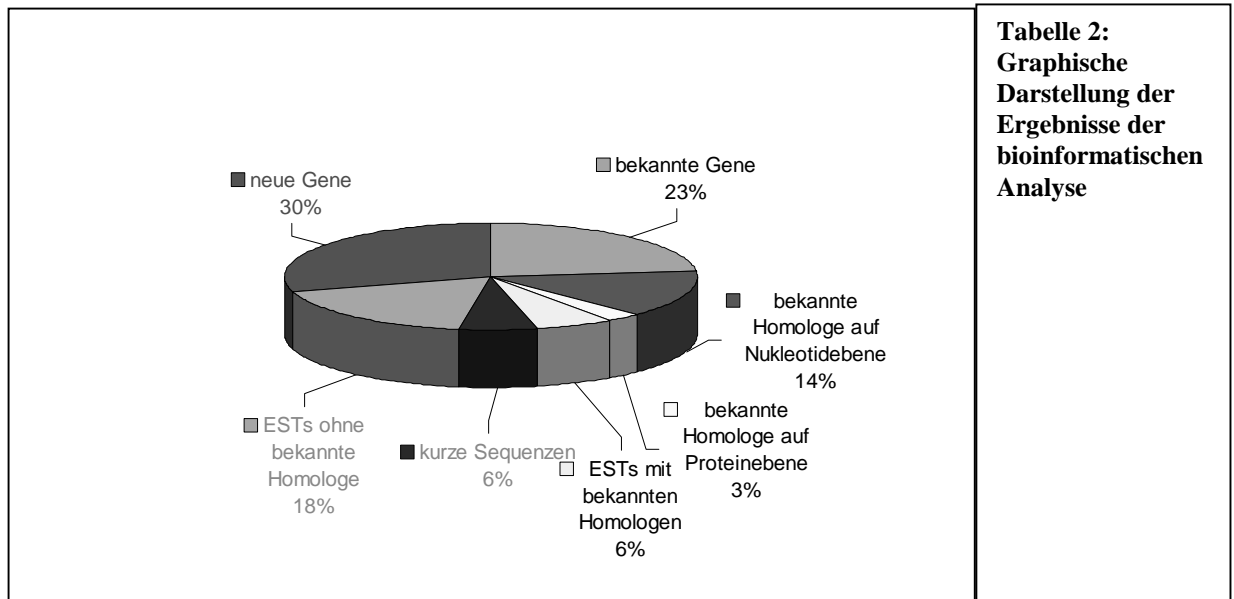
These data indicated that this cDNA-library contained many of the hitherto known taste-specific genes and was therefore most suitable for the identification of novel receptor genes. In order to protect intellectual property rights on the identified novel genes a patent application was prepared and filed at EPO (See further details at ).

### I.II.III.VIII. Verlauf der weiteren bioinformatischen Analyse der cDNA-Klone

Die Sequenzen von 4087 willkürlich ausgewählten cDNA-Klonen aus den subtraktiven Banken tb1, tb2 und tb3 wurden durch die LION Bioscience AG zunächst redundanzeliminiert, was in 1962 unterschiedlichen cDNA-Sequenzen resultierte. Diese wurden bei LION mit einer dortigen Kopie der Unigene-Datenbank (NCBI) verglichen, um bereits annotierte Gene und „expressed sequence tags“ (ESTs) zu identifizieren. Um nur identische Gene bzw. deren Orthologe in anderen Spezies zu detektieren, wurden bei diesem Vergleich hohe Stringenzbedingungen (>95% Sequenzidentität zu Ratten-Genen, >90% zu Maus-Genen, >70% zu humanen Genen) angelegt. Um weiter entfernte Homologe zu detektieren, wurde eine weitere BLAST-Suche gegen Nukleotid und Protein-Datenbanken (EMBL) mit niedrigerer Stringenz bei Unilever Research durchgeführt. 121 Sequenzen mit einer Länge von weniger als 100 Nukleotiden sind nicht für die nachfolgende PCR-Analyse verwendbar; die entsprechenden Klone werden deshalb erneut sequenziert. Die quantitative Auswertung der oben beschriebenen Analysen sind in Tabelle und Schaubild zusammengefasst.

bekannte Gene	458	23,3%
bekannte Homologe auf Nukleotidebene	277	14,1%
bekannte Homologe auf Proteinebene	56	2,9%
ESTs mit bekannten Homologen	117	6,0%
kurze Sequenzen	121	6,2%
ESTs ohne bekannte Homologe	354	18,0%
neue Gene	579	29,5%
gesamt	1962	

**Tabelle 1:**  
Quantitative  
Auswertung der  
bioinformatischen  
Analyse



Nach Aussortieren von Klonen, die aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Genen für diese Studie nicht interessant erschienen, verblieben 52 Sequenzen mit Ähnlichkeit zu möglichen Signaltransduktionskomponenten, 579 neue Gene sowie 354 Gene, die bereits als ESTs in anderen Geweben beschrieben wurden. Gegen diese Sequenzen wurden mit Hilfe der DoPrimer-Software (JSoft/Interactiva) spezifische Oligonukleotid-Primer berechnet.

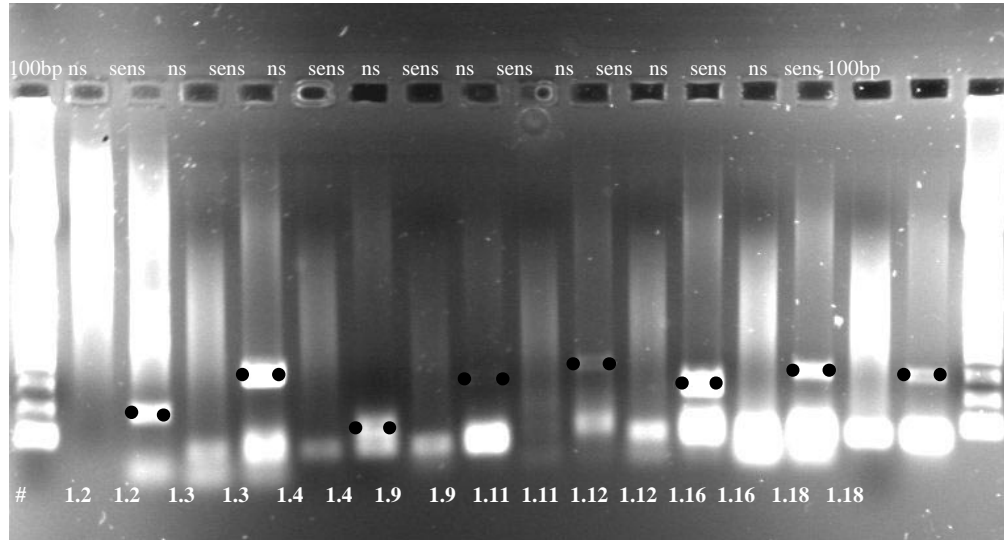
#### Differentielle PCR-Analyse neuer Gene

Klone der cDNA Banken tb1 (foliate Papillen), tb2 und tb3 (fungiforme Papillen) ohne signifikante Homologie zu publizierten Gen- bzw. Proteinsequenzen wurden mittels differentieller PCR-Experimente analysiert. Die PCR-Experimente wurden an Gruppen von jeweils 96 unbekanntem Genen mittels spezifischer Oligonukleotid-Primer und cDNA-Pools von Gewebe aus dem nicht sensorischen, bzw. sensorischen Bereich circumvallater, foliater und fungiformer Geschmackspapillen unter Standard-PCR-Bedingungen durchgeführt.

PCR Programm:      94°C   0:30  
                              55°C   1:30  
                              72°C   0:30  
                              39 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden im Gel analysiert und die Größe der amplifizierten PCR-Produkte kontrolliert. Nach dem in Abb.1 dokumentierten Schema wurden bis zu 4 unterschiedliche PCR-Runden pro Klon durchgeführt. Um falsch positive Ergebnisse zu minimieren wurden für Gene, die im PCR- Experiment als spezifisch sensorisch exprimiert identifiziert wurden Dokumentations-Gele angefertigt; d.h. PCR-Produkte aus nicht-sensorischem und sensorischem Gewebe direkt im Gel miteinander verglichen. Abb.2 zeigt exemplarisch ein Dokumentations-Gel der ersten Analyse-Runde. Dabei wurden die Mitglieder der unterschiedlichen cDNA Banken (tb1, tb2 und tb3) gruppiert.

Für Gene, deren Expression in keinem der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden konnte, soll zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchungen die Primerwahl überprüft werden.



**Abb.2 Dokumentations-Gel aus Runde 1.1 – 1.96: tb1 novel genes, (ns = nicht sensorisches Gewebe um die circumvallate Papille, sens = sensorisches Gewebe circumvallate Papille, 100bp = molekularer Marker)**

#### Test-Runde für differentielle PCR

Um eine Testrunde der differentiellen PCR-Analysen durchführen zu können, wurden uns von der Firma Lion vorab die Sequenzen von cDNA-Klonen einer 384-well Platte zur Verfügung gestellt. Untersucht wurden alle neuen Gene und cDNAs mit einer signifikanten Homologie zu bereits beschriebenen EST Klonen, die für das Projekt interessant sein könnten.

In der tabellarischen Auflistung wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ns cv	nichtsensorisches Epithel im Bereich der circumvallaten Papille
cv sens	circumvallate Papille, sensorisches Epithel
foliate sens	foliate Papille, sensorisches Epithel
ns fungi	nicht sensorisches Epithel im Bereich der fungiformen Papillen
fungi sens	fungiforme Papillen, sensorisches Epithel
+	positives PCR-Ergebnis
-	negatives PCR-Ergebnis

#### PCR Ergebnis Runde 1.1 –1.96:

tb1 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	50,0 % differential clones
	ns cv +	7	38,8	
	ns cv -; cv sens +	8	44,4	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens +	1	5,6	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens -	2	11,1	
	total	18		

tb2 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	15,7 %  differential clones
	ns cv +	9	47,3	
	ns cv -; cv sens +	1	5,3	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens +	2	10,5	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens -; ns fungi +	3	15,7	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens -; ns fungi -	4	21,0	
	total	19		

tb3 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	25,9 %  differential clones
	ns cv +	5	18,5	
	ns cv -; cv sens +	6	23,0	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens +	1	3,7	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens -; ns fungi +	12	44,4	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens -; ns fungi -	3	11,1	
	total	27		

tb1 known genes (EST's)	PCR – results	number of clones	% of total	18,8 %  differential clones
	ns cv +	26	81,3	
	ns cv -; cv sens +	4	12,5	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens +	2	6,3	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens -	0	0	
	total	32		

Bei der Untersuchung der Klone der cDNA Banken tb1 (foliate Papillen) und tb2 + 3 (fungiforme Papillen) zeigte sich ein Anteil von ca. 19% - 50% differentieller Klone.

### Ergebnisse der differentiellen PCR Runde 2 – 4

PCR Ergebnis Runde 2.1 – 2.96:

tb1 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	26,7 %  differential clones
	ns cv +	7	46,7	
	ns cv -; cv sens +	4	26,7	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens +	0	0,0	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens -	4	26,7	
total	15			

tb2 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	10,0 %  differential clones
	ns cv +	8	80,0	
	ns cv -; cv sens +	0	0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens +	1	10,0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens -	1	10,0	
total	10			

tb3 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	11,1 %  differential clones
	ns cv +	6	66,7	
	ns cv -; cv sens +	1	11,1	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens +	0	0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	1	11,1	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens -; ns fungi -	1	11,1	
	total	9		

cv cluster	PCR – results	number of clones	% of total	11,0 %  differential clones
	ns cv +	20	37,0	
	ns cv -; cv sens +	5	9,3	
	ns cv -	2	3,7	
foliate cluster	ns cv -; cv sens -; foliate sens +	1	1,9	differential clones
	ns cv -; cv sens -; foliate sens -	2	3,7	
fungi cluster	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	17	31,5	differential clones
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens +	0	0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens -	7	13,0	
	total	54		

Insgesamt 8 Klone der Runde 2.1 – 2.96 waren aufgrund der geringen Sequenzinformation (<100 BP) für eine PCR-Analyse ungeeignet.

#### PCR Ergebnis Runde 3.1 – 3.96:

Cluster  tb1 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	9,3 %  differential clones
	ns cv+	31	72,1	
	ns cv -	12		
	ns cv -; cv sens +	2	4,6	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens +	2	4,6	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens -	8	18,6	
	total	43		

Cluster  tb2 novel genes	PCR – results	number of clones	% of total	10,3 %  differential clones
	ns cv +	11	37,9	
	ns cv -	18		
	ns cv -; cv sens+	2	6,9	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	6	20,7	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens +	1	3,4	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens -	9	31	
	total	29		

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	
tb3 novel genes	ns cv +	2	20,0	0 %
	ns cv -	8		
	ns cv -; cv sens +	0	0	differential clones
	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	4	20,0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens +	0	0	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens -; ns fungi -	4	40,0	
	total	10		

## PCR Ergebnis Runde 4.1 – 4.96:

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	
tb1 novel genes	ns cv+	21	53,8	7,7 %
	ns cv -	18		
	ns cv -; cv sens +	3	7,7	differential clones
	ns cv -; cv sens -; foliate sens +	0	0	
	ns cv -; cv sens -; foliate sens -	15	38,4	
	total	39		

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	
tb2 novel genes	ns cv +	3	42,8	14,2 %
	ns cv -	4		
	ns cv -; cv sens+	0	0	differential clones
	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	2	28,5	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens +	1	14,2	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens -	1	14,2	
	total	7		

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	
tb3 novel genes	ns cv +	22	48,8	11,0 %
	ns cv -	23		
	ns cv -; cv sens +	2	4,4	differential clones
	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	6	13,3	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -; fungi sens +	3	6,6	
	ns cv -; cv sens -; fungi sens -; ns fungi -	12	26,6	
	total	45		

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	0 %  differential clones
	tb1-tb3 novel genes	ns cv +	1	
	total	1		

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	25,0 %  differential clones
	tb2-tb3 novel genes	ns cv +	2	
	ns cv -	2		
	cv sens +	1	25,0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	1	25,0	
	total	4		

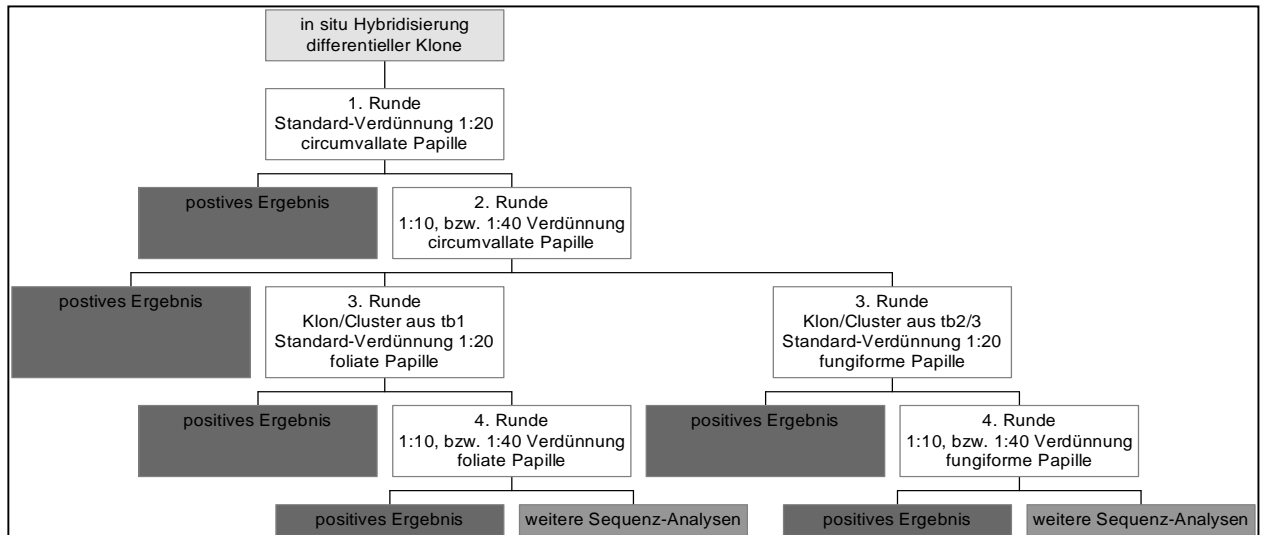
Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	50,0 %  differential clones
	tb1-tb3 novel genes	ns cv +	0	
	ns cv -	4		
	ns cv -; cv sens +	1	25,0	
	ns cv -; cv sens -; fol sens +	0	0	
	ns sens -; cv sens -; fol sens -, ns fungi +	0	0	
	ns -; cv -; fungi -; ns fungi -, fungi sens +	1	25,0	
	ns -; cv -; fungi -; ns fungi -, fungi sens -	2	50,0	
	total	4		

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	0 %  differential clones
	tb2-tb3 novel genes	ns cv +	4	
	ns cv -	2		
	cv sens +	0	0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi +	1	16,6	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -, fungi sens +	0	0	
	ns cv -; cv sens -; ns fungi -, fungi sens -	1	16,6	
	total	6		

Cluster	PCR – results	number of clones	% of total	50,0 %  differential clones
	tb1-tb2-tb3 novel genes	ns cv +	2	
	ns cv -; cv sens +	2	50,0	
	total	4		

In Situ Hybridisierungs-Experimente PCR-differentieller Klone

Für PCR-differentielle Gene, die spezifisch im sensorischen Bereich der Zunge, d.h. in den Geschmackspapillen exprimiert werden, wurden in einem ersten Analyseschritt *in situ* Hybridisierungsexperimente an Cryostat-Schnitten von circumvallaten Papillen durchgeführt (Abb. 3).



**Abb.3** *In situ* Hybridisierung PCR-differentieller Klone

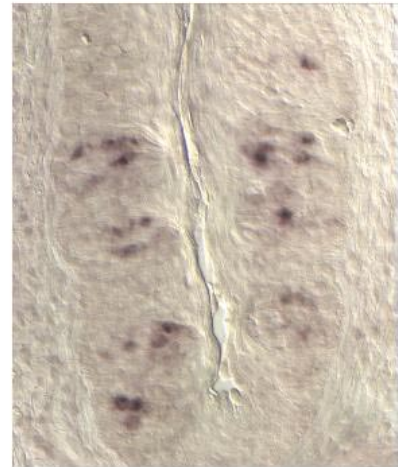
Für die ersten 384 Klone wurden bereits erste *in situ* Hybridisierungs-Experimente an circumvallaten Papillen durchgeführt, die eine differentielle Expression fuer viele der identifizierten Gene bestätigen (Siehe Photos auf der nächsten Seite).

Es zeigen dabei die Klone #3.12, #3.25 und #3.66 markierte Zellen innerhalb der Geschmacksknospen im Bereich der Geschmackssinneszellen.

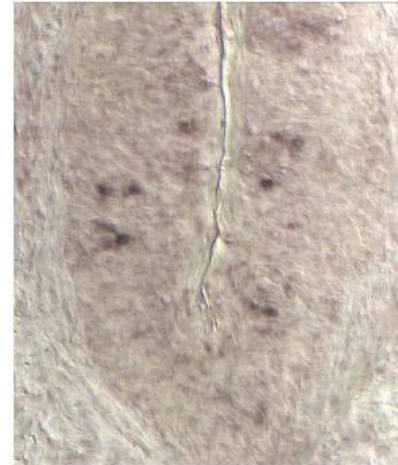


## PCR 3.1 - 3.96

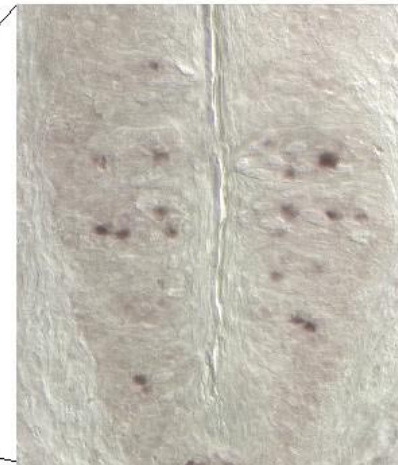
#3.12 cl274ct276cn2  
(tb1)



#3.25 cl338ct341cn3  
(tb1)



#3.66 cl56ct57cn63  
(tb1-tb3)



## **II. Voraussichtlicher Nutzen (Verwertbarkeit)**

### **II.I. Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (hENaC) induzieren**

Die im Rahmen des ersten Screenings identifizierten Testpeptide (Siehe Abschnitt I.I.I.III.) werden als potentielle Salzgeschmacks-Verstärker zur Zeit in sensorischen Studien weiter analysiert. Es wurde dazu auch schon ein Patentantrag vorbereitet, der nach Abschluss dieser Evaluierungen eingereicht werden soll.

Darüberhinaus wird das molekulare Suchsystem zur Zeit verbessert (Siehe Abschnitt I.I.I.IV.), um auch für andere Naturstoff-Bibliotheken angewendet zu werden.

### **II.II. Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden**

Die im Rahmen des Teilprojekts „Konstruktion eines Hefestammes zur Identifizierung und Klonierung des Süß-Rezeptors von Geschmackssinneszellen“ (Siehe Abschnitt I.II.II.) entwickelte Technologie ist von generellem Nutzen für die Identifizierung von Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Anwendbarkeit für Geschmacksrezeptoren wird zur Zeit im Unilever-Forschungslabor Vlaardingen geprüft. Es ist jedoch vermutlich nicht patentrichtlich verwertbar, da schon „Prior Art“ durch verschiedene Forschungsgruppen demonstriert werden konnte (Glaxo-Patent, Literatur).

Die im Rahmen des Teilprojekts „Identifizierung von Süß- und anderen Geschmacksrezeptoren“ (Siehe Abschnitt I.II.III.) identifizierten Gensequenzen konnten als Fragmente von bekannten Genen mit bekannter oder unbekannter Funktion als auch von bisher unbekanntem Genen angesprochen werden (Siehe Abschnitte I.II.III.VII und I.II.III.VIII für weitere Details). Hierbei konnten aufgrund dieser Daten zum Beispiel 10 bisher unbekannte humane Bitter-Rezeptoren identifiziert werden. Es wurde daher zum Schutz der Verwertbarkeit dieser Daten EP 01200408.1 (Titel: Nucleic acids encoding proteins expressed in sensory cells) am 5 Februar 2001 bei der Europäischen Patent-Organisation (EPO) eingereicht.

Eine Analyse unserer Patentabteilung zeigte, daß die diesem Patentantrag zugrundeliegende Argumentationskette (Es konnte bisher die spezifische Lokalisierung dieser Gene in Geschmacksgewebe gezeigt werden) nur beschränkten Schutz vor unlicenzierte Verwertung durch Dritte bietet. Es wurden daher die identifizierten Gene hinsichtlich ihrer vermutlichen Verwertbarkeit klassifiziert und mit entsprechender Priorität eine detaillierte Funktionsanalyse durchgeführt, die sehr präzise und valide Patentanträge erlauben sollten: So laufen momentan funktionelle Expressionstudien mit den identifizierten humanen Homologen der putativen Geschmacksrezeptoren sowie des putativen RGS-proteins (Regulator of G-Protein Signalling), um mit Hilfe von präzise formulierbaren Schutzrechtsansprüchen bezüglich der Funktion dieser Moleküle (Auch hinsichtlich des Einflusses dieser

Moleküle auf spezifische Geschmacksmodalitäten) spezifische und dadurch patentrechtlich stärkere Anträge formulieren zu können. Eine Veröffentlichung dieser Daten ist ebenfalls in Vorbereitung.

### **III. Fortschritt ausserhalb des Projektes**

#### ***III.I. Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (hENaC) induzieren***

In einer Studie von Kretz et al. (1999) konnte die Anwesenheit und die differentielle Expression von RNA und Proteinen der drei Untereinheiten des ENaC-Komplexes in Geschmacksknospen der Ratte gezeigt werden, die die funktionellen Studien zur Involvierung dieser Kanäle beim Salzgeschmack auf molekularem Niveau unterstützen.

Zusätzlich ist in der Zwischenzeit eine Studie zur Modulierung der Aktivität des epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals der Ratte (rENaC) bekannt geworden, wo mit Hilfe einer konstitutiv aktiven Mutante Peptide identifiziert werden konnten, die diesen Kanälen inhibieren (Ji et al., 1999). Diese Studie legt nahe, daß auch der hENaC in seiner Aktivität durch Peptide (und andere Substanzen) moduliert werden kann.

Darüber hinaus sind bisher noch keine alternativen Testsysteme für hENaCs bekannt geworden. Eine Studie von Canessa et al. zeigte die Problematik der heterologen Expression in Hefen auf, wo trotz verschiedener Ansätze keine funktionell aktiven ENaC-Komplexe in der Membran registriert werden konnten.

#### ***III.II. Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden***

Der ursprüngliche Ansatz zur Identifizierung des Thaumatinrezeptors (Siehe Abschnitt I.II.I.) musste im Projektverlauf verändert werden: Es zeigte sich, daß in heterologen Expressionsansätzen nicht die notwendige Expressionsrate von Bindungsstellen für radioaktiv markiertes Thaumatin erzielt werden konnten, um eine weiterführende Isolierung der entsprechenden cDNA-Populationen erreichen zu können. Vor wenigen Wochen sind im Labor von Prof. C. Zuker experimentelle Daten produziert worden, die darauf hinweisen, daß Süßrezeptoren in Säugern vermutlich aus heterodimeren Proteinkomplexen bestehen (Nelson et al., 2001): Ihre Studien legen nahe, daß eine rekombinante Expression der einzelnen Untereinheiten kaum möglich ist, erst die Kombination zeigte eine funktionelle Aktivierbarkeit durch einige Süßstoffe, jedoch nicht durch Süßproteine wie Thaumatin. Diese Daten bestätigten die langgehegte Annahme, daß G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) die Süßantwort vermitteln, was auch aufgrund neuester genetischer Studien als wahrscheinlich erschien (Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001). Die Autoren interpretieren die Daten dahingehend, daß ein noch unbekannter Rezeptor oder eine unbekanntere Rezeptorkombination für die Geschmackswirkung von Süßproteinen verantwortlich sein dürfte. Diese Daten zeigen andererseits auch, daß im ursprünglichen Ansatz die Erfolgswahrscheinlichkeit verschwindend gering war, da vermutlich nur die

gleichzeitige Anwesenheit von 2 unterschiedlichen Rezeptor-mRNAs zur funktionellen Expression des Thaumatinrezeptors geführt hätte.

## **IV. Veröffentlichungen**

### ***IV.I. Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (hENaC) induzieren***

Details des Ligandensuchsystems und identifizierte Modulatoren der Aktivität von hENaCs werden zur Wahrung der Priorität für die geplanten Schutzrechtsanmeldungen erst später veröffentlicht werden (Siehe II.III.I).

### ***IV.II. Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden***

Die erfolgreiche Identifizierung von neuen Geschmacksrezeptorkandidaten und weiteren Molekülen, die bei der Geschmackswahrnehmung involviert sind, ist ebenfalls zur Veröffentlichung vorgesehen. Auch hier werden mit Hinsicht auf die kommerzielle Verwertbarkeit zunächst Schutzrechtsanmeldungen geprüft, bevor die erarbeiteten Resultate veröffentlicht werden können (Siehe auch II.I.III.II). Dazu laufen momentan funktionelle Expressionstudien mit den identifizierten humanen Homologen der putativen Geschmacksrezeptoren sowie des putativen RGS-proteins (Regulator of G-Protein Signalling), um mit Hilfe von präzise formulierbaren Schutzrechtsansprüchen bezüglich der Funktion dieser Moleküle (Auch hinsichtlich des Einflusses dieser Moleküle auf spezifische Geschmacksmodalitäten) spezifische und dadurch patentrechtlich stärkere Anträge formulieren zu können. Eine Veröffentlichung dieser Daten ist ebenfalls in Vorbereitung und in Anschluß daran geplant.

## V. Literatur:

- Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J.P. und C.S. Zuker. A novel Family of mammalian taste receptors. *Cell* **100**, 693-702 (2000).
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J.D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition. Garland Publishing, New York, 1994.
- Appell, K.C., T.D.Y. Chung, M.J.H. Ohlmeyer, N.H. Sigal, J.J. Baldwin und D. Chelsky. Biological screening of a large combinatorial library. *J. Biomol. Screen.* **1**, 27-31 (1996).
- Avenet, P. und B. Lindemann. Transduction in taste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase. *Nature* **331**, 351-355 (1988).
- Baranski TJ, Herzmark P, Lichtarge O, Gerber BO, Trueheart J, Meng EC, Liri T, Sheikh SP, and Bourne HR (1999) C5a receptor activation. Genetic identification of critical residues in four transmembrane helices. *J. Biol.Chem* **274**: 15757-15765.
- Barbry, P. und M. Lazdunski (1995)
- Bernhardt, S.J., M. Naim, U. Zehav und B. Lindemann. Changes in IP<sub>3</sub> and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J. Physiol.* **490** [2], 325-336 (1996).
- Brann, R.M., T. Messier, C. Dorman und D. Lannigan. Cell-based assays for G-protein-coupled / Tyrosine kinase-coupled receptors. *J. Biomol. Screen.* **1**, 43-45 (1996).
- Brown AJ, Dyos SL, Whiteway MS, White JH, Watson MA, Marzioch M, Clare JJ, Cousens DJ, Paddon C, Plumpton C, Romanos MA and Dowell SJ (2000) Functional coupling of mammalian receptors to the yeast mating pathway using novel yeast/mammalian G protein alpha-subunit chimeras. *Yeast* **16**:11-22.
- Brown AJ and Dowell SJ. G protein chimeras. EP1012311 A1. PCT Publication Number: WO9914344
- Canessa, C.M., L. Schild, G. Buell, B. Thorens, I. Gautschi, J.-D. Horisberger, und B.C. Rossier. Amiloride-Sensitive Epithelial Na<sup>+</sup> Channel is Made of Three Homologous Subunits. *Nature* **367**, 463-467, (1994).
- Chandrashekar J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng, L. Guo, W., C.S. Zuker und N.J.P. Ryba. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **100**, 703-711 (2000).
- Chaudari, N., Landin, A.M. und S.D. Roper. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature Neuroscience* **3**(2), 113-119 (2000).
- Chen, W., T.S. Shells, P.J.S. Stork und R.D. Stone. A colorimetric assay for measuring activation of G<sub>s</sub>- and G<sub>q</sub>-coupled pathways. *Analyt. Biochem.* **226**, 349-354 (1995).
- Cummings, T.A., J. Powell, und S.C. Kinnamon. Sweet Taste Transduction in Hamster Taste Cells: Evidence for the Role of Cyclic Nucleotides. *J. Neurophys.* **70**, 2326-2336, (1993).
- Doolin, R.E und T.A. Gilbertson. Distribution and Characterization of Functional Amiloride-sensitive Sodium Channels in Rat Tongue. *J. Gen. Phys.* **107**, 545-554 (1996).
- Ellis, J.W., Overview of Sweeteners., *J. Chem. Educ.* **72**, 671-675, (1995).

- Erlenbach, I.; Kostenis, E.; Schmidt, C.; Gal, C.S.; Raufaste, D.; Dumont, M.E.; Pausch, M.H.; Wess, J. (2001) Single amino acid substitutions and deletions that alter the G protein coupling properties of the V2 vasopressin receptor identified in yeast by receptor random mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **276**: 29382-29392.
- Faurion, A., S. Saito, und P. MacLeod. Sweet Taste Involves Several Distinct Receptor Mechanisms. *Chem. Senses* **5**, 107-120, (1980).
- Feigin, A.M., Y. Ninomiya, S.M. Bezrukov, B.P. Bryant, P.A. Moore, M. Komai, M. Wachowiak, J.H. Teeter, I. Wodyanov und J.G. Brand. Enhancement of gustatory nerve fibers to NaCl and Formation of Ion channels by a commercial preparation of Novobiocin. *Am. J. Phys.* **266**, C1165-C1172 (1994).
- Fukuwatari T., Kawada, T., Tsuruta, M., und T. Fushiki. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett.* **414**, 461-464 (1997).
- Gerald, C., M.W. Walker, P.J. Vaysse, C. He, T.A. Branchek, und R.L. Weinshank. Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/Peptide YY Y2 receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **270** [45], 26758-26761, (1995).
- Glaser, D., G. Hellekant, J.N. Brouwer, und H. v.d. Wel. The taste responses in primates in response to the proteins Thaumatin and monellin and their phylogenetic implications. *Folia Primatolog.* **29**, 56-63, (1978).
- Heck, G.L., S. Mierson, und J.A. DeSimone. Salt Taste Transduction Occurs Through an Amiloride-sensitive Sodium Transport Pathway. *Science* **223**, 403-405, (1984).
- Heinrich, P. C., L. Graeve, S. Rose-John, J. Schneider-Mergener, E. Dittrich, A. Erren, C. Herhartz, U. Hemmann, C. Lütticken, U.M. Wegenka, O. Weiergräber, und H. Friedemann. Membrane-bound and soluble interleukin-6 receptor: studies on structure, regulation of expression and signal transduction, *Ann. New York Acad. Sci.*, (1996).
- Hellekant, G., und Y. Ninomiya. On the Taste of Umami in Chimpanzee. *Physiology & Behavior* **49**, 927-934, (1991).
- Hoon, M.A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, J.R.P. und C.S. Zuker. Putative mammalian taste receptors: A class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* **96**, 541-551 (1999).
- Huang, L., Shankar, G., Dubauskaite, J., Max, M. und RF Margolskee. Gg13 colocalises with Gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nature Neuroscience* **2**(12), 1055-1063 (1999).
- Ilani, A., D. Lichtstein, und M.B. Becaner. Bretylium Opens Mucosal Amiloride-Sensitive Sodium Channels. *Biochim. Biophys. Acta* **693**: 503-506, (1982).
- Ishimoto, H., Matsumoto, A. und T. Tanimura. Molecular identification of a taste receptor gene for Trehalose in *Drosophila*. *Science* **289**, 116-119 (2000).
- Ji, H.-J., Fuller, C.M. und D.J. Benos. Peptide inhibition of constitutively activated epithelial Na<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 37.693-37.704 (1999).
- Kiefer, H., J. Krieger, J.D. Olszewski, G. v.Heijne, G.D. Prestwich und H. Breer. Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: Purification, reconstitution and ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.*, (1996)
- Kinghorn, A.D. and E.J. Kennelly. Discovery of highly sweet compounds from natural sources. *J. Chem. Educ.* **72**(5), 676-680, (1995).

- Kramer, A., A. Schuster, U. Reineke, R. Malin, R. Volkmer-Engert, C. Landgraf, und J. Schneider-Mergener. Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tool for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity. *METHODS (Comp. Meth. Enzymol.)* **6**, 388-395 (1994).
- Kramer, A., R. Volkmer-Engert, R. Malin, U. Reineke, und J. Schneider-Mergener. Simultaneous synthesis of peptide libraries on single resin and continuous membrane supports: identification of protein, metal and DNA binding peptide mixtures. *Peptide Res.* **6**, 314-319 (1993).
- Kretz, O., Barbry, P., Bock, R. und B. Lindemann. Differential expression of RNA and Protein of the three pore-forming subunits of the Amiloride-sensitive epithelial sodium channel in taste buds of the rat. *J. of Histochem. & Cytochemistry* **47**(1), 51-64 (1999).
- Kroll, B., S. Bremer, B. Tuemmler, G. Kottra, und E. Froemter. Sodium Dependence of the Epithelial Sodium Conductance expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. *Pfl. Arch.* **419**, 101-107, (1991).
- Li, J.H.-Y., J. Cragoe, E.J., und B. Lindemann. Structure-Activity Relationship of Amiloride Analogs as Blockers of Epithelial Na Channels II: Side-Chain Modifications. *J. Membr. Biol.* **95**, 171-185, (1987).
- Li, J.H.-Y., und B. Lindemann. Chemical Stimulation of Na Transport Through Amiloride-Blockable Channels of Frog Skin Epithelium. *J. Membrane Biol.* **75**, 179-192, (1983).
- Li, M, W. Yu, C.-H. Chen, S. Cwirla, E. Whitehorn, E. Tate, R. Raab, M. Bremer und B. Dower. *In vitro* selection of peptides acting at a new site of NMDA glutamate receptors. *Nature Biotechn.* **14**, 986-991 (1996).
- Lindemann, B. Taste Reception. *Phys. Rev.* **76**(3), 719-766 (1996).
- Lindemann, B., Gilbertson, T.A. and S.C. Kinnamon. Amiloride-sensitive sodium channels in taste. *Current Topics in Membranes* **47**, 315-336 (199).
- Margolskee, B., Receptor Mechanisms in Gustation, In: "Handbook of Olfaction and Gustation" (ed. R. Doty), Marcel Dekker Inc., New York 1995, 575-596.
- Max, M., Shankar, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Darnak, S. und R.F. Margolskee. Tas1R3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nature Genetics* **28**, 58-63 (2001).
- McLaughlin, S.K, McKinnon, P.J. und R.F. Margolskee. Gustducin is a taste-cell specific G protein closely related to the transducins. *Nature* **357**, 563-569 (1992).
- Montmayeur, J.-P., Liberles, S.D., Matsunami, H. und L.H. Buck. A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neuroscience* **4**(5), 492-499 (2001).
- Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J.P. und C.S. Zuker. Mammalian sweet receptors. *Cell* **106**, 381-390 (2001).
- v.Nickisch-Rosenegk, E., J. Krieger, S. Kubick, R. Laage, J. Strobel, J. Strotmann, H. Breer. Cloning of biogenic Amine receptors from moths (*Bombyx mori* and *Heliothis virescens*). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, In Druck (1996).
- Price LA, Kajkowski EM, Hadcock JR, Ozenberger BA and Pausch MH (1995) Functional coupling of a mammalian somatostatin receptor to the yeast pheromone response pathway. *Mol.Cell Biol.* **15**: 6188-6195

- Raming, K., J. Krieger, J. Strotmann, I. Boekhoff, S. Kubick, C. Baumstark und H. Breer. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature* **361**, 353-356, (1993).
- Schiffman, S.S., E. Lockhead, und F.W. Maes. Amiloride Reduces the Taste Intensity of Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> Salts and Sweeteners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6136-6140, (1983).
- Schneider-Mergener, J., A. Kramer, und U. Reineke. Cellulose-bound peptide libraries as a tool to study molecular recognition. In: Cortese, R. ed., *Combinatorial Libraries*, W. de Gruyter, Berlin, in Druck (1995).
- Shallenberger, R.S., und T.E. Acree. Molecular Theory of Sweet Taste. *Nature* **216**: 480-482, (1967).
- Shimazaki, K., M. Sato und M. Nakao. Photoaffinity labelling of Thaumatin-binding protein in monkey circumvallate papillae. *Biochim. Biophys. Acta* **884**, 291-298, (1986).
- Striem, B., U. Pace, U. Zehavi, M. Naim, und D. Lancet. Sweet Tastants Stimulate Adenylate Cyclase Coupled to GTP-Binding Protein In Rat Tongue Membranes. *Biochem. J.* **260**, 121-126, (1989).
- Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E. und L. Birnbaumer. A *Xenopus* oocyte beta subunit: Evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (5), p. 1703-1708, (1997).
- Tinti, J.-M., und C. Nofre. Why Does a Sweetener Taste Sweet? Washington DC: American Chemical Society, 206-213, (1991).
- Thomson, D.M.H., Tunaley, A. und H.C.M. v. Trijp. A reappraisal of the use of multidimensional scaling to investigate the sensory characteristics of sweeteners. *J. of Sensory Studies* **2**, 215-230 (1987).
- Voilley, N., E. Lingueglia, G. Champigny, M.-G. Mattei, R. Waldmann, M. Lazdunski, und P. Barbry. The Lung Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> Channel: Biophysical Properties, Pharmacology, Ontogenesis, and Molecular Cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 247-251, (1994).
- Voilley, N., F. Bassilana, C. Mignon, S. Merscher, M.-G. Mattei, G. F. Carle, M. Lazdunski, und P. Barbry. Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the  $\beta$  and  $\gamma$  subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel. *Genomics* **28**: 560-565, (1995).
- Volkmer-Engert, R., B. Ehrhard, W. Höhne, B. Ehrhard, A. Kramer, J. Hellwig, und J. Schneider-Mergener. Preparation, analysis and antibody binding studies of simultaneously synthesized soluble and cellulose-bound HIV-1 p24 peptide epitope libraries. *Lett. Peptide Sci.* **1**, 243-253 (1994).
- Weiergräber, O., J. Schneider-Mergener, J. Grotzinger, A. Wollmer, A. Kuster, M. Exner und P.C. Heinrich. Use of immobilized synthetic peptides for the identification of contact sites between human interleukin-6 and its receptor. *FEBS Lett.* **379**, 122-126 (1996).
- Wel, H. v.d. und K. Arvidson. Qualitative psychophysical studies on the gustatory effects of the sweet tasting proteins Thaumatin and monellin. *Chem. Senses Flav.* **3**, 291-297 (1978).
- Wel, H. v.d. und K. Loeve. Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus danielli* Benth. *Eur. J. Biochem.* **31**, 221-, (1972).



Winkler, D., A. Schuster, B. Hoffmann, und J. Schneider Mergener. Synthesis of cyclic peptide libraries bound to continuous cellulose membrane supports. In: Maia, H. L. S. ed., Peptides 1994, ESCOM, Leiden, 485-486 (1995).

## **Anlage II: Berichtsblatt mit Kurzfassung**

### **1. ISBN**

Geplant

### **2. Berichtsart**

Abschlußbericht

### **3. A) Titel des Berichts**

Abschlußbericht des Verbundprojekts ‚Naturstoffe als neue funktionelle Salz- und Süßstoffe zur Gesundheitsprophylaxe‘

### **B) Titel der Publikation**

Geplant

### **4. A) Autoren des Berichts**

Breer, Heinz<sup>5</sup>; Conzelmann, Sidonie<sup>5</sup>; Dietmeier, Klaus<sup>3</sup>; Freitag, Joachim<sup>5</sup>;  
Gouka, Robin<sup>2</sup>; Kaiser, Carmen<sup>4</sup>; Ragotzky, Klaus<sup>1</sup>; Schneider-Mergener, Jens<sup>3</sup>;  
Tareilus, Erwin<sup>2</sup>; von Buchholz, Lars<sup>5</sup>

### **B) Autoren des Berichts**

Geplant

### **5. Abschlußdatum des Vorhabens**

31.12.2000

### **6. Veröffentlichungsdatum**

Geplant

### **7. Form der Publikation**

Geplant

### **8. Durchführende Institutionen (Name, Adresse)**

1. Union deutsche Lebensmittelwerke, Hamburg
2. Unilever Research Vlaardingen, Vlaardingen (NL)
3. JERINI Biotools AG, Berlin
4. LION Biosciences AG, Heidelberg
5. Institut für Physiologie der Universität Hohenheim, Stuttgart

### **9. Ber.Nr Durchführende Institution**

### **10. Förderkennzeichen**

Geplant

### **11. A) Seitenzahl Bericht**

### **B) Seitenzahl Publikation**

Geplant

## **12. Literaturangaben**

Geplant

## **13. Fördernde Institution**

Geplant

## **14. Tabellen**

Geplant

## **15. Abbildungen**

Geplant

## **16. Zusätzliche Angaben**

Geplant

## **17. Vorgelegt bei:**

Geplant

## **18. Kurzfassung**

Diese Projekt hatte 2 Zielsetzungen:

- 1.) Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (hENaC) induzieren
- 2.) Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden

Im ersten Teilprojekt konnte ein Funktionalitätstest für konstitutiv aktive Na<sup>+</sup>-Kanäle entwickelt werden, der für hohen Probendurchsatz geeignet ist. Mit Hilfe dieses Systems konnte eine Reihe von potentiellen hENaC-Liganden mit modulatorischen Effekten identifiziert werden, die in sensorischen Studien auf ihre Verwendbarkeit naeher geprüft werden. Es wurde jedoch auch die begrenzte Langzeitstabilität der Expression von humane epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanälen in verschiedenen rekombinanten Säugerzelllinien aufgezeigt. Dieser Effekt erfordert ein kontinuierliche Kontrolle der Expressionsrate und eine Minimalisierung der Wachstumsbehinderung für Säugerzelllinien.

Im zweiten Teilprojekt wurden 3 Ansätze zur Identifizierung von Geschmacksrezeptoren geprüft (1. Expressionsklonierung eines Thaumatinrezeptorgens in Säugerzellen, 2. Konstruktion eines Hefestammes zur Identifizierung von Süßrezeptoren, 3. Identifizierung von geschmackszellspezifischen Genen) wobei beim 2. Ansatz ein Testsystem für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aufgebaut werden konnte, daß auf der Basis eines in Hefen eingebrachten Reportergens arbeitet. Die Robustheit dieses Testsystems macht es dabei besonders attraktiv als Suchverfahren für einen bekannten Testrezeptor.

Im dritten Ansatz konnte mit Hilfe einer neuartigen Kombination von Subtraktions-PCR und cDNA-Array-Analyse eine Expressionsdatenbank für Geschmackszellen erstellt werden, die einen Grossteil aller spezifisch exprimierten Gene enthält.

In dieser Datenbank konnten sowohl bekannte als auch neue Geschmacksrezeptorkandidaten identifiziert werden. Einige dieser Gene werden zur Zeit in heterologen Expressionssystemen auf ihre Funktionalität getestet.

**19. Schlagwörter**

**20. Verlag**

Geplant

**21. Preis**

Geplant

Geplant